

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | | |
|--|--|-----------|---|
| (51) International Patent Classification ⁶ : C07K 14/145, A61K 39/205, C12N 15/40, C07H 21/04 | | A1 | (11) International Publication Number: WO 99/29723 |
| | | | (43) International Publication Date: 17 June 1999 (17.06.99) |
| (21) International Application Number: PCT/US98/25922 | | | (81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |
| (22) International Filing Date: 7 December 1998 (07.12.98) | | | |
| (30) Priority Data: 08/986,659 8 December 1997 (08.12.97) US | | | |
| (71) Applicants: PENTAMER PHARMACEUTICALS [US/US]; 11545 Sorrento Valley Road, San Diego, CA 92121 (US). THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE [US/US]; 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US). | | | |
| (72) Inventor: HALL, Stephen, G.; 11577-4 Compass Point Drive North, San Diego, CA 92126 (US). | | | |
| (74) Agents: CEPURITIS, Talivaldis; Olson & Hierl, Ltd., Suite 3600, 20 North Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US) et al. | | | Published <i>With international search report.</i> |
| (54) Title: RECOMBINANT NODAVIRUS COMPOSITIONS AND METHODS | | | |
| (57) Abstract <p>Recombinant nodavirus related compositions are disclosed. These compositions include chimeric proteins in which a nodavirus capsid protein is present together with a heterologous peptide segment. The heterologous peptide includes at least one cell-specific targeting sequence, such as a B cell epitope, a T cell epitope, or a sequence specific for another cell type, such as a hepatocyte. The chimeric proteins can be assembled to form chimeric virus-like particles. The chimeric virus-like particles are useful in therapeutic applications, such as vaccines and gene-delivery vectors, and in diagnostic applications, such as kits for the testing of body tissue or fluid samples. Methods for the use of recombinant nodavirus related compositions in therapeutic and diagnostic applications are also described.</p> | | | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-525422

(P2001-525422A)

(43) 公表日 平成13年12月11日 (2001.12.11)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード* (参考) |
|---------------------------|------|----------------|-------------|
| C 0 7 K 14/145 | | C 0 7 K 14/145 | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 39/205 | | A 6 1 K 39/205 | 4 B 0 6 4 |
| A 6 1 P 31/12 | | A 6 1 P 31/12 | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 1/15 | | C 1 2 N 1/15 | 4 C 0 8 5 |
| 1/19 | | 1/19 | 4 H 0 4 5 |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-524314(P2000-524314)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月7日 (1998.12.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年6月8日 (2000.6.8)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 2 5 9 2 2
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 2 9 7 2 3
 (87) 国際公開日 平成11年6月17日 (1999.6.17)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 9 8 6 , 6 5 9
 (32) 優先日 平成9年12月8日 (1997.12.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ベンタマー・ファーマシューティカルズ・
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92121、
 サン・ディエゴ、ソレント・バリー・ロー
 ド・11545
 (71) 出願人 ザ・スクリプス・リサーチ・インスティテ
 ユート
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、
 ラ・ホーヤ、ノース・トレイ・バインズ・
 ロード・10550、メイル・ドロツプ・テイ
 ー・ビー・シー-8
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えノダウイルス組成物及び方法

(57) 【要約】

組換えノダウイルス関連組成物が開示される。これらの組成物は、ノダウイルス・カプシド・タンパク質が異種ペプチド・セグメントと共に存在するキメラ・タンパク質を含む。異種ペプチドは、B細胞エピトープ、T細胞エピトープ又は肝細胞のような他の細胞型に特異的な配列のような少なくとも1つの細胞特異的ターゲティング配列を含む。キメラ・タンパク質は、集合してキメラ・ウイルス様粒子を形成することができる。キメラ・ウイルス様粒子は、ワクチン及び遺伝子輸送ベクターのような治療適用において、そして体組織又は液体試料を試験するためのキットのような診断適用において有用である。治療適用及び診断適用における組換えノダウイルス関連組成物の使用の方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 逆平行ベータバレルにより構成されるコア構造を有する、欠失を含まないノダウイルス（n o d a v i r u s）カプシド・タンパク質と、該ベータバレルのうちの鎖対間に位置する異種ペプチド・セグメントとを含むキメラ・タンパク質。

【請求項2】 欠失を含まず、かつそのアミノ末端から205番目のアミノ酸残基と209番目のアミノ残基との間の領域に異種ペプチド・セグメントを含有するフロックハウスウイルス（F l o c k H o u s e v i r u s）カプシド・タンパク質を含むキメラ・タンパク質。

【請求項3】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、及び配列番号：9からなる群のうちの1つである、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項4】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：1により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項5】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：2により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項6】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：3により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項7】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：4により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項8】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：5により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項9】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：6により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項10】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：7により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項11】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：8により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項12】 異種タンパク質セグメントが、配列番号：9により表される、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項13】 異種ペプチドが、B細胞エピトープ、T細胞エピトープ、CTLエピトープ、及び肝細胞ターゲティング配列からなる群より選択される少なくとも1つの細胞特異的ターゲティング配列を含む、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項14】 異種ペプチドが、B細胞エピトープ及びT細胞エピトープの両方を含む、請求項2に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項15】 請求項1に記載のキメラ・タンパク質を含むワクチン組成物。

【請求項16】 請求項1に記載のキメラ・タンパク質を含む診断キット。

【請求項17】 請求項1に記載のキメラ・タンパク質をコードする発現ベクター。

【請求項18】 請求項2に記載のキメラ・タンパク質を含むワクチン組成物。

【請求項19】 請求項2に記載のキメラ・タンパク質を含む診断キット。

【請求項20】 請求項2に記載のキメラ・タンパク質をコードする発現ベクター。

【請求項21】 少なくとも1つの請求項1に記載のキメラ・タンパク質を含有するカプシドを含むキメラ・ウイルス様粒子。

【請求項22】 請求項21に記載のキメラ・ウイルス様粒子を含むワクチン組成物。

【請求項23】 少なくとも1つの請求項2に記載のキメラ・タンパク質を含有するカプシドを含むキメラ・ウイルス様粒子。

【請求項24】 請求項23に記載のキメラ・ウイルス様粒子を含むワクチン組成物。

【請求項25】 異なる異種ペプチドを有する少なくとも2つの請求項1に記載のキメラ・タンパク質を含有するカプシドを含む多価キメラ・ウイルス様粒子。

【請求項26】 異なる異種ペプチドを有する少なくとも2つの請求項2に記載のキメラ・タンパク質を含有するカプシドを含む多価キメラ・ウイルス様粒子。

【請求項27】 請求項1に記載のキメラ・タンパク質を産生する真核細胞発現系。

【請求項28】 請求項2に記載のキメラ・タンパク質を産生する真核細胞発現系。

【請求項29】 薬学的に許容される賦形剤に含まれた有効量の請求項1に記載に定義されたキメラ・タンパク質を投与する工程を含む、動物において免疫応答を誘導する方法。

【請求項30】 薬学的に許容される賦形剤に含まれた有効量の請求項2に記載に定義されたキメラ・タンパク質を投与する工程を含む、動物において免疫応答を誘導する方法。

【請求項31】 生物学的活性を有するキメラ・カプシド・タンパク質の輸送のためのノダウイルス系。

【請求項32】 生物学的活性を有するキメラ・カプシド・タンパク質が免疫刺激因子である、請求項31に記載のノダウイルス系。

【請求項33】 請求項1に定義されたキメラ・タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

【請求項34】 請求項2に定義されたキメラ・タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

【請求項35】 請求項1に記載のキメラ・タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有するノダウイルス・カプシド・タンパク質遺伝子。

【請求項36】 請求項2に記載のキメラ・タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有するノダウイルス・カプシド・タンパク質遺伝子。

【請求項37】 請求項1に記載のキメラ・タンパク質をコードするノダウイルス・カプシド・タンパク質遺伝子を含むバキュロウイルス発現系。

【請求項38】 請求項2に記載のキメラ・タンパク質をコードするノダウイルス・カプシド・タンパク質遺伝子を含むバキュロウイルス発現系。

【請求項39】 抗原性ペプチドと連結した請求項1に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項40】 抗原性ペプチドがB SRV Fタンパク質の一部を含む、請求項39に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項41】 抗原性ペプチドが、アミノ酸残基Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Serにより構成される、請求項39に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項42】 抗原性ペプチドが、アミノ酸残基Cys Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Serにより構成される、請求項39に記載のキメラ・タンパク質。

【請求項43】 抗原性ペプチドと連結したノダウイルス粒子。

【請求項44】 抗原性ペプチドがB SRV Fタンパク質の一部を含む、請求項43に記載のノダウイルス粒子。

【請求項45】 抗原性ペプチドが、アミノ酸残基Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Serにより構成される、請求項43に記載記載のノダウイルス粒子。

【請求項46】 抗原性ペプチドが、アミノ酸残基Cys Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Serにより構成される、請求項43に記載記載のノダウイルス粒子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、抗原性ペプチドのようなキメラ・ノダウイルス (nodavirus) 関連タンパク質、及びそれらの使用に関する。本発明はまた、キメラ・ノダウイルス関連タンパク質を含むウイルス様粒子、及びそれらの使用にも関する。

【0002】

(背景技術)

免疫系は、系中の病原体を処理するためのいくつかの異なる機序を有している (Parker, D. C. 1993. Annu. Rev. Immunol. 11: 331-360; Clinical Immunology: Principles and Practice. Vols. 1 and 2. ed (Fleisher ら、1996. Mosby-Year Book, Inc. New York, NY)。免疫応答における第1段階は、ヘルパーT細胞と呼ばれる特別なサブクラスのTリンパ球の活性化である。マクロファージが、外来タンパク質又は抗原の断片をその表面に提示する。次に、ヘルパーT細胞上に見られる特異的な受容体によるこれらの抗原の認識が、細胞性免疫応答及び体液性免疫応答という2つの応答を開始させる。

【0003】

細胞性応答には、原則的に、感染細胞を認識し破壊する、細胞障害性Tリンパ球 (CTL) と呼ばれる、もう1つのサブクラスのTリンパ球の刺激が含まれる。HLAクラスI拘束分子が、細胞内でプロセッシングを受けたペプチドに結合し、CD8+T細胞による細胞内ウイルスの排除を可能にする。体液性応答が、ウイルスを中和し、最初の感染からの感染細胞の数を減少させることができる抗体を生成させるため、CTLは、免疫防御の第2の系列である。CD4+T (Th) 細胞は、体液性応答を補助する能力により測定される、ヘルパー表現型を有することが多い。Th細胞は、他の細胞のエフェクター機能を促進するよう機能し、そして抗ウイルス活性が限定されているが、抗体産生B細胞との分子間協力の提供において主要な役割を果たす (Vitetta ら、1989. Adv. I

mmunol. 45:1; Hodes, R. J. p. 587 In: 1989. Fundamental immunology, eds Paul, W. E.)。

【0004】

他方、体液性応答は、循環血中抗体を産生する、第2の主要なクラスのリンパ球、B細胞の活性化を含む。抗体は、可溶性抗原を認識し、中和し、貪食細胞による破壊のため抗原を保有する細胞又はウイルスをマークする。HLAクラスII分子は、外因性抗原性ペプチドをクラスII拘束CD4+B細胞へ提示する。抗体は、いくつかの機序によりウイルスの感染性を減少させる効率的な手段としてはたらく。侵入した病原体上の表面抗原に対する抗体応答は極めて強いことがあり、抗体はウイルス粒子の力価を有意に減少させることができる可能性がある。さらに、抗体は、表面抗原との相互作用を通して、侵入した病原体の構造的完全性を変化させ、ウイルスを非感染性にすることができる。病原体の中和は、細胞受容体との相互作用の阻害、及び／又は細胞質へのエンドサイトーシスの阻害によっても起こりうる(Ruggeri, F. M. and Greenberg, H. B. J. Virol. 1991; 2211-2219) Dimmock, N. J. In: Current Topics in microbiology and immunology. 1993. Springer-Verlag: New York)。

【0005】

有効なワクチンの開発は、ウイルス性疾患の発生率の劇的な減少傾向をもたらした最も決定的な進歩の1つである。ワクチン接種は、ワクチン接種された対象において「感作された」状態を誘導し、抗原への曝露後に、迅速な二次免疫応答が生じるようにし、生物の加速された排除及び臨床的疾患からの防御をもたらす。ワクチンの設計には、抗原性及び予防の効力と共に、系の安全性に対する注意が必要である。

【0006】

しばらく以前より、抗原に対する体液性応答と細胞性応答はかなり異なっている場合があることが知られている。一般に、抗原のB細胞エピトープは比較的長

く、立体的エピトープとして知られている。立体的エピトープは、抗体による効率的な認識に、適切な3次元構造を必要とする（Elnerら、, 1977. J. Immunol. 118:2053）。対照的に、T細胞は通常、配列情報に基づき小さい直鎖状エピトープを認識する。ウイルス又は細菌の感染に対する効率的な抵抗性は、体液性成分及び細胞性成分の両方の活性を必要とするため、B細胞及びT細胞の両方に対する抗原の提示を最適化することが重要である。

【0007】

エピトープ提示系の最近の進歩にもかかわらず、遺伝学的に、B細胞エピトープ及びT細胞エピトープを同時に発現することができ、さらにこれらのエピトープを適切な状況で免疫系に提示することができる系が、当分野において依然として必要とされている。

【0008】

同一担体系におけるT細胞エピトープ及びB細胞エピトープの同時発現は、B細胞とT細胞との間の協力的な機序を通して抗体応答を増強することが可能であるという証拠が存在する。例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）に類似した担体系を通してHBVエンベロープ・タンパク質特異的B細胞を刺激することにより、B型肝炎に対する増強されたB細胞ワクチンが可能である（Chisari, F. V. 1995. pp. 29-60 In: Annu. Rev. Immunol.）。この担体又は類似体がTh細胞エピトープを有する場合、これらのThエピトープのその後のプロセッシングはB細胞の増殖を誘導することができる。例えば、HBV除去は、エンベロープ抗原、ヌクレオカプシド抗原、及びポリメラーゼ抗原に対する活発なポリクローン性のB細胞及びT細胞の応答に依存する。HBVのヌクレオカプシド抗原及びポリメラーゼ抗原に対する抗体応答はよく理解されていないが、HBVエンベロープ抗原に対する抗体応答がT細胞協力を必要とすることは極めて明らかである。HBV除去に必要な活発な免疫応答の必要性にもかかわらず、急性及び慢性の肝炎におけるクラスII拘束エンベロープ特異的応答は極めて低い。Thエピトープのプロセッシングは、B細胞及び抗エンベロープ抗体の増殖を誘導することができる。担体系を介してB細胞エピトープ及びTh細胞エピトープの曝露を増加させることにより、B細胞とTh細胞との間の

協力を増強する効率的な手段は、患者において疾患の寛解をもたらす可能性が高いであろう。抗原提示細胞（APC）にHBV決定基を適切に提示することにより、HBVに類似した担体系を通してHBVエンベロープ特異的B細胞を刺激することにより、B型肝炎に対する増強されたB細胞ワクチンが可能であるという証拠が存在する。

【0009】

急性の症例においてはクラスI拘束CTLの実質的な応答が存在するが、ウイルスを除去することができていない、慢性感染患者においては、HBVに対するCTL応答は容易には検出されない。B細胞とTh細胞との間の協力と共に活発なCTL増幅が誘導できれば、HBV感染だけでなく多くのその他の感染性疾患及び癌の治療にとって極めて大きな意義があるであろう。

【0010】

最近、ワクチン接種戦法には著しい進歩があったが、現在の戦法には未だ改良の必要が残っている。組換え病原性ウイルスは、最も強い体液性応答及び細胞性応答を誘導することが多いが、ベクターの安全性及び既存の免疫への干渉の可能性のため、継続的な使用にとって魅力的な系とはなっていない。ペプチド・ワクチンは、強い単機能性免疫応答を有し比較的安全であることが示されている。これらの利点にも関わらず、それらは免疫原性が弱い傾向があり、遺伝学的に異なる個体集団において見出される、異なるMHC決定基に選択的に結合する能力が限定されている。多数のペプチドを単一のワクチンへと製剤化することは可能であるが、そのような企ては非常に面倒な作業である。遺伝学的免疫又はDNAワクチンは、有望であることが示されているが、APCを標的とする能力は示されておらず、広範なポリクローン性の応答を生じる。これらの進歩にもかかわらず、現行の技術は、免疫系のB細胞及びT細胞を効率的に感作する、B細胞エピトープ及びT細胞エピトープの同時発現が可能な系を提供していない。

【0011】

これらの制限的ではない例において、よく解明されているリガンドを挿入領域内に含み、さらに治療用遺伝子又はアンチセンスのエンカプシレーションを含むよう、遺伝子工学的に作出された、ノダウイルス又は具体的にはブロックハウス

ウイルス (Flock House Virus) (FHV) のキメラ・コート・タンパク質構築物が作成された。

【0012】

遺伝子輸送又は遺伝子治療とは、(タンパク質の発現のための) 機能的遺伝子又は(タンパク質の翻訳を遮断するための) アンチセンス分子の体細胞への輸送と定義されうる。例えば、Felgner ら、の米国特許第5, 589, 466号及びBrighamの米国特許第5, 676, 954号を参照のこと。概説については、Mitani, K, and Caskey, C. T. (1993) TIBTECH 11:162-166; Findels, M. A. ら、(1993) TIBTECH 11:202-205; Freidmann, T. (1994) TIG:10:210-214; Smith, C. (1994) TIG:10:139-144; Karpati ら、(1996) TIBS 19:49-54; Calos, M. P. (1996) TIG:12:463-466を参照のこと。様々な疾患、並びに後天性及び遺伝的な障害を治療するために使用されている、いくつかの遺伝子輸送技術を、表1に要約する。

【0013】

【表1】

表1 遺伝子輸送技術の比較

| ベクター | 挿入サイズ* | 組み込み | 導入効率 | 利点 | 欠点 |
|---|--------|------------|------|----------------------------|--|
| ヒトウイルス | 8kB | する | 高い | 分裂性細胞の安定的な形質転換。 | 急速分裂細胞にのみ感染する。発癌の可能性有り。 |
| アデノウイルス | <7.5kB | しない | 高い | 分裂性又は非分裂性のほぼ全ての細胞型を形質転換する。 | 高い一過性発現が免疫応答を誘発する。通常のヒトウイルス。 |
| アデノ随伴ウイルス (AAV) | <4kB | する(第19染色体) | 高い | 安定的な形質転換。 | 小さい挿入サイズ。組み込みはよく理解されていない。ヘルペスウイルスを必要とする。 |
| ヘルペス単純ウイルス (HSV) | <20kB | しない | 低い | 大きい挿入サイズ。ニューロン特異的。 | 一過性発現。ヒトにおいて感染性HSVを生じる可能性有り。 |
| ワクチニア | <25kB | しない | 高い | 様々な細胞に効率的に感染する。 | 高い天然痘ワクチンを接種されていない又は免疫不全の個体に限定される。 |
| リポソーム | >20kB | しない | N/A | 大きい挿入サイズ。 | 変動性の輸送と組み合わせられた一過性発現が欠点である。 |
| バリスティック (Ballistic) (「ハイバリスティック (Biollistic)」) 注入 | >20kB | しない | N/A | 大きい挿入サイズ。 | 露出した組織を必要とする。 |
| プラスミド DNA 注入 | >20kB | しない | N/A | 大きい挿入サイズ。 | 輸送効率が低い。筋肉のみにおける持続的発現。 |

【0014】

ウイルス抗原をディスプレイする組換えフロックハウスウイルス (FHV) タンパク質が記載されている (Tisminetzky, S. G. ら、, FEBS Lett. 353:1-4 (1994); Scodeller, E. A. ら、Vaccine, 13:1233-1239 (1995); Buratti, E. ら、J. Immunol. Methods, 197:7-18 (1996); Schiappacassi, M. ら、J. Virol. Methods. 63

: 121-127 (1997); Buratti, E. ら、Clin. Diagn. Lab. Immunol., 4: 117-12 (1997))。Baralle, F. E. ら、, PCT公開出願WO96/05293 (1996) も参照のこと。しかし、これらの従来の試みは、カプシド・タンパク質の1つ又は複数の領域におけるアミノ酸残基の欠失のため、ウイルス様粒子の形成が困難であるという問題を抱えていた。

【0015】

必要とされるのは、100アミノ酸残基又はそれ以上の長さの異種ペプチドを取り込むことができ、かつキメラ・ウイルス様粒子へと自己集合することができる組換えノダウイルス関連タンパク質である。

【0016】

(発明の開示)

本発明は、逆平行ベータバレルにより構成されるコア構造を有する、欠失を含まないノダウイルス・カプシド (又はコート) タンパク質と、ベータバレルの鎖対間に位置する異種ペプチド・セグメントとを含むキメラ・タンパク質を提供する。好ましいキメラ・タンパク質は、フロックハウスウイルス・カプシド・タンパク質と、カプシド・タンパク質のアミノ末端から205番目のアミノ酸残基と209番目のアミノ酸残基との間の位置に存在する異種ペプチド・セグメントとのキメラ・タンパク質である。ノダウイルス・カプシド・タンパク質に通常存在する全てのアミノ酸残基が保持されている。異種ペプチド・セグメントのアミノ酸配列は、B細胞エピトープ、T細胞エピトープ、及びその他の細胞型に対するターゲティング配列のような、細胞特異的ターゲティング配列から選択される。異種ペプチド・セグメントは、最大約100アミノ酸残基のサイズを有することができる。

【0017】

本発明の実施形態は、生物学的活性を有する物質を輸送するための、キメラ・カプシド・タンパク質を含有するノダウイルス系である。生物学的活性を有する部分は、直接的な免疫刺激因子、間接的な免疫刺激因子、直接的な免疫刺激因子をコードする遺伝子、又は間接的な免疫刺激因子をコードする遺伝子でありうる。

。抗原性タンパク質と連結したキメラ・タンパク質及びノダウイルス粒子は、有効な免疫刺激因子又は免疫調節因子として機能することができ、診断及び免疫の目的のため有用である。

【0018】

本発明によると、前記のような非病原性ベクターの必要性が、ワクチンを含む治療用組成物、及び診断キットのような診断的实施形態を提供する新規なウイルス様型の系により満たされる。フロックハウスウイルス（FHV）は、その表面に抗原性ペプチドを有するウイルス様粒子を遺伝子工学的に作出するために使用されるそのようなノダウイルスの1つである。この系の基本は、FHVカプシド・タンパク質の著しい機能的用途の広さを中心としている。FHVの高解像度原子構造の詳細な化学的コンピュータ解析は、ウイルスのコート又はカプシドの集合に影響を与えることなく、異種ペプチド・セグメントを挿入することができる、カプシド・タンパク質中の領域の同定をもたらした。構造的コンピュータ解析からの予測を使用して、挿入された異種ペプチドとして、よく解明された抗原決定基を含むFHV様キメラ・ウイルス様粒子が遺伝子工学的に構築された。これらの挿入された異種ペプチドは、適切な立体的構造で担体の表面に提示され、体液性応答を生じるB細胞エピトープを含む。T細胞エピトープを含有するもののような、その他の異種ペプチド・セグメントが、そのようなキメラ・ウイルス様粒子の表面上に発現され、増殖応答及びCTL応答を生じる構造が作製されている。キメラ・タンパク質を形成するために挿入された、隣接するB細胞エピトープ及びT細胞エピトープを含む異種ペプチド・セグメントは、増強された免疫原性を示した。

【0019】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明は、キメラウイルス様粒子へと自己集合することができるキメラ・タンパク質を産生するため、下記の表2に挙げられるような、ノダウイルスとして一般的に知られているノダウイルス科に属するウイルスを使用する。

【0020】

【表2】

表2 ノダウイルス

| ウイルス名 | 細胞培養における繁殖 | タンパク質発現系 |
|---|---|---------------------|
| ノダムラウイルス (Nodamura virus) (NV) | BHK-21 細胞、カ細胞 | ハネムシウイルス発現系及び大腸菌発現系 |
| フロックハウスウイルス(FHV) | ショウジョウバエ細胞、ブラックビートル(Black Beetle)細胞、プロトプラスト | ハネムシウイルス発現系及び大腸菌発現系 |
| ブラックビートルウイルス (Black Beetle virus) (BBV) | | |
| ブーラウイルス(Boolarra virus) (BoV) | | |
| ジプシーモスウイルス(Gypsy moth virus) (GMV) | | |
| マナワツウイルス(Manawatu virus) (MwV) | | |

【0021】

適当なノダウイルスには、ノダムラウイルス (NV)、フロックハウスウイルス (FHV)、ブラックビートルウイルス (BBV)、ブーラウイルス (BoV)、ジプシーモスウイルス (GMV) 及びマナワツウイルス (MwV) が含まれる。好ましいノダウイルスは、フロックハウスウイルス (FHV) である。

【0022】

カプシド・タンパク質としても知られるフロックハウスウイルスのコート・タンパク質の構造を図1に示す。このタンパク質のアミノ酸残基配列は、以下の通りである。ここでは、左から右に向かって、アミノ酸末端又はN末端からカルボキシ末端又はC末端への配列が示されている。

【0023】

【化1】

Met Val Asn Asn Asn Arg Pro Arg Arg Glu
 Arg Ala Glu Arg Val Val Val Thr Thr Thr
 Glu Thr Ala Pro Val Pro Glu Glu Asn Val
 Pro Arg Asn Gly Arg Arg Arg Arg Asn Arg
 Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg Gly
 Met Asn Met Ala Ala Leu Thr Arg Leu Ser
 Gln Pro Gly Leu Ala Phe Leu Lys Cys Ala
 Phe Ala Pro Pro Asp Phe Asn Thr Asp Pro
 Gly Lys Gly Ile Pro Asp Arg Phe Glu Gly
 Lys Val Val Ser Arg Lys Asp Val Leu Asn
 Gln Ser Ile Ser Phe Thr Ala Gly Gln Asp
 Thr Phe Ile Leu Ile Ala Pro Thr Pro Gly
 Val Ala Tyr Trp Ser Ala Ser Val Pro Arg
 Gly Thr Phe Pro Thr Ser Ala Thr Thr Phe
 Asn Pro Val Asn Tyr Pro Gly Phe Thr Ser
 Met Phe Gly Thr Thr Ser Thr Ser Arg Ser
 Asp Gln Val Ser Ser Phe Arg Tyr Ala Ser

【0024】

【化2】

Asp Gln Val Ser Ser Phe Arg Tyr Ala Ser
 Met Asn Val Gly Ile Tyr Pro Thr Ser Asn
 Leu Met Gln Phe Ala Gly Ser Ile Thr Val
 Trp Lys Cys Pro Val Lys Leu Ser Thr Val
 Gln Phe Pro Val Ala Thr Asp Pro Ala Thr
 Ser Ser Leu Val His Thr Leu Val Gly Leu
 Asp Gly Val Leu Ala Val Gly Pro Asp Asn
 Phe Ser Glu Ser Phe Ile Lys Gly Val Phe
 Ser Gln Ser Ala Cys Asn Glu Pro Asp Phe
 Glu Phe Asn Asp Ile Leu Glu Gly Ile Gln
 Thr Leu Pro Pro Ala Asn Val Ser Leu Gly
 Ser Thr Gly Gln Pro Phe Thr Met Asp Ser
 Gly Ala Glu Ala Thr Ser Gly Val Val Gly
 Trp Gly Asn Met Asp Thr Ile Val Ile Arg
 Val Ser Ala Pro Glu Gly Ala Val Asn Ser
 Ala Ile Leu Lys Ala Trp Ser Cys Ile Glu
 Tyr Arg Pro Asn Pro Asn Ala Met Leu Tyr
 Gln Phe Gly His Asp Ser Pro Pro Leu Asp
 Glu Val Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Thr Val
 Ala Arg Ser Leu Pro Val Ala Val Ile Ala
 Ala Gln Asn Ala Ser Met Trp Glu Arg Val
 Lys Ser Ile Ile Lys Ser Ser Leu Ala Ala
 Ala Ser Asn Ile Pro Gly Pro Ile Gly Val
 Ala Ala Ser Gly Ile Ser Gly Leu Ser Ala
 Leu Phe Glu Gly Phe Gly Phe (SEQ ID NO:10)

【0025】

上記のアミノ酸残基配列に対するヌクレオチド配列は既知であり、Dasgupta, R. ら、, Nucleic Acids Res. 17 (18) : 75

25-7526 (1989) に記載されている。

【0026】

構造のコアは、他の多くのウイルスのカプシドタンパク質に見られるように、逆平行鎖8本から成るベータバレルで構成されている。ヘリックスドメインは、3本のヘリックス状アルファ鎖で構成され、ベータバレルに対してN末端及びC末端に連続的に位置するポリペプチド鎖によって形成されている。ヘリックスはガンマペプチドであり、開裂産物の1つである。「N」末端から205-209番アミノ酸の間の領域はループを形成し、集合したカプシドの外部表面に露出している。形成されたループは、ベータバレルのベータE鎖-ベータF鎖間に存在する。図1に見られるように、挿入それ自体は一对のベータ鎖、ベータE'-ベータ"を形成し、その間に短いループを有する。

【0027】

カプシド内に含まれるFHVゲノムは、2種類のメッセンジャーセンスRNA分子、RNA1及びRNA2を含んでいる (Schneemann, A., 他、1933, W. Doerfler及びP. Bhm編集、「ウイルス戦略 (Viral Strategies)」, Verlag, Chemie, Weinheim, Germany, p167-176)。RNA1 (3.1 kb) は、RNAに依存する推定RNAポリメラーゼである、タンパク質A (102 kDa) の合成を支配する (Fischer, A. J. 及びJ. E. Johnson, 1993, Nature (London) 361:176-179)。RNA2 (1.4 kb) は、コートタンパク質前駆体のタンパク質アルファ (43 kDa) をコードする (Gallagher, T. M. 及びR. R. Rueckert, 1998, J. Virol. 62:3399-3406)。ゲノムRNAばかりでなく、感染細胞も、RNA1の3'末端から誘導されるサブゲノムRNA3 (0.4 kb) を含んでいる。それは、複製を変調させるタンパク質B (10 kDa) をコードする (Ball, L. A. (1994) PNAS 91:12443-12447; Ball, L. A. (1995) J. Virol. 69:720-727)。

【0028】

FHV RNA 2の特定の領域(186-217塩基)は、予想されたステム-ループ構造を有し(図2)、RNA 2を*in vivo*でエンカプシデーションするためのパッケージング・シグナルとして働く(Zhong, W., Dasgupta, R., 及びRueckert, R. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11146-11150)。図2に示す他のノダウイルスRNA 2配列の類似領域も同じ機能を果たす。最初の工程は、コートタンパク質の下位構造とウイルスRNA上のこのエンカプシデーション・シグナルとが相互作用する核形成複合体(nucleating complex)の形成を含むものと考えられる。この開始複合体は、ウイルスRNAに結合することによって成長外殻内へ誘導されるコートタンパク質サブユニットを添加すると、成長して球形粒子を形成する可能性がある。

【0029】

フロックハウスウイルス(FHV)は、*Drosophila*細胞培養液中、約5時間及び8時間でそれぞれピークに達するタンパク質A及びBの合成を伴って増殖し、高力価を与えることができる(Schneemann, A., ら、1933, W. Doerfler及びP. Bhm編集、「ウイルス戦略(Viral Strategies)」, Verlag, Chemie, Weinheim, Germany, p167-176)。それに対して、タンパク質アルファの合成は、最初の12時間は低いままにとどまり、その後急速に上昇し、約15時間で生産はピークに達する。新たに合成されたアルファ鎖は数分間のうちに集合し、プロビリオンと呼ばれる不安定な前駆体粒子となる。プロビリオンは正20面体対称配置を取る180個のアルファサブユニット及びゲノムRNA分子のそれぞれのコピーを含む。集合過程は、407個のアミノ酸アルファ鎖における自己加水分解反応の引き金を引き、363アスパラギンと364アラニンの間の切断を引き起こす(Hosur, M. V. ら、1987. Proteins: Struct. Funct. Genet. 2:167-176; Fisher, A. J. 及びJ. E. Johnson, 1993, Nature (London) 361:176-179)。

【0030】

新たに形成されたベータ (38 kDa、363 番アミノ酸) 及びガンマ (5 kDa、44 番アミノ酸) ポリペプチドは成熟したビリオンと会合したままの状態であるとどまる。

【0031】

ブタ、親マウス、ウサギ、モルモット、シリアハムスタ及びニワトリに野生型 FHV を注射すると、症状または発病を伴わないで抗体が形成される。さらに、霊長類の腎臓及びヒト羊膜を含む哺乳動物の細胞培養系統に細胞病理学的な現象は認められない (Hendry, D. A. 1991. 「無脊椎動物のウイルス (Viruses of Invertebrates)」 (E. Krustack 編) Marcel Dekker, Inc., New York)。

【0032】

FHV の構造は原子レベルまで解明され、正 20 面体対称によって関連づけられる 3 個の同等なポリペプチドから成るウイルスカプシドは 60 個の三角形単位で構成されていることを明らかにしている (Hosur, M. V. ら、1987. *Struc. Funct. Genet.* 2:167-176)。A、B 及び C で呼ばれる 3 個すべてのサブユニットは、他の多くのウイルス構造に観察されるものと類似する中心ベータバレル構造を含む (Rossmann, M. G. 及び J. E. Johnson, 1989, *Ann. Rev. Biochem.* 58:533-573)。外部表面はベータ鎖の間の精巧なループから成り、内部表面はタンパク質のアミノ末端及びカルボキシ末端からのヘリックスドメインで構成されている。タンパク質のアミノ末端によって形成されるヘリックスドメインは、20-30 アミノ酸残基が秩序を持ったペプチドの「アーム」を構成している C サブユニットについてのみ、見ることができる。A サブユニットと B サブユニットの場合、アミノ末端が無秩序であり、電子密度図で見ることができない。この変化は、正 20 面体の 2 回軸及び疑似 2 回軸を横切るサブユニットの接触の有意な違いとなって現れる。疑似 2 回軸 (A/A_2 及び C/B_2) を横切るタンパク質サブユニット間の相互作用は屈曲しているのに対して、2 回軸 (C/B_2 及び C_2/B の接触) を横切る相互作用は平坦である。その理由は、C サブユニットのペプチドのアームが、サブユニット間の蝶つがい部分に折り畳まれ、疑

似2回軸に見られる二面角の形成が阻止されることにある。さらに、2回軸の平坦な接合部はC/C₂接合部の間でくさびを形成するゲノムRNAのセグメントによって安定化されるが、A/B₂接合部ではこのようなことは起こらない。

【0033】

アルファタンパク質の開裂部位は、RNAコア近くのビリオンの内部深くにある。このことがプロテイナーゼ阻害剤およびウイルスを沈殿させる抗体の接近を不可能にしている。開裂産物ガンマ（カルボキシ末端残基364-407）は粒子内部に位置し、両親媒性ヘリックスを形成する。2回対称軸ではガンマヘリックスが秩序ある二重らせんRNAと相互作用するのに対して、5回軸ではヘリックスの親水性表面間の相互作用によって安定化される5量体ヘリカルバンドルを形成する（Cheng, H. R. の他, 1994. Structure 2: 271-282）。

【0034】

FHVゲノムへの外来配列（foreign sequences）の挿入部位の確認

FHVの高分解能原子構造の計算機化学分析およびゲノムの分子遺伝子分析によって、ウイルスの集合に影響を与えないで約100個までのアミノ酸の挿入による突然変異の誘発を受ける可能性のあるコートタンパク質サブユニットの領域が確認されている。コートタンパク質のこの領域は205-209アミノ酸を含み、そしてウイルス表面上に露出されたループである（図1）。ノダウイルス科に属する他のウイルスのそれぞれの表面にも相当するループを見ることができる。

【0035】

本発明の好ましい実施形態に従えば、FHVのコートタンパク質遺伝子内部の特定の位置は、ウイルスの集合過程の遮断を受けることなく、約300個の塩基対まで（約100個のアミノ酸残基まで）外来配列の挿入を受けることができる。その位置は、上で述べたように、タンパク質のコア構造の隣接するベータバレル間にある。

【0036】

本発明はFHV様のキメラタンパク質を産生する方法並びにタンパク質の診断及び治療分野への応用を提供するものである。

【0037】

FHV様の多価キメラタンパク質は挿入された異種 (heterologous) ペプチドセグメントと共に複数個の特定の細胞シグナルを与える。たとえば、両ウシ呼吸器細胞合胞体ウイルス (BRSV) Fタンパク質はB細胞エピトープとT細胞エピトープの両者から成る (表3)。このような多価キメラタンパク質は、高い力価で産生することができ、そして、バキュロウイルス発現系に導入して調製することが好ましい。

【0038】

次に、多価キメラウイルス様粒子は、バキュロウイルス発現系で多価キメラタンパク質を発現、集合させることによって調製することができる。別の方法として、少なくとも2種類のキメラタンパク質から成る多価キメラウイルス様粒子をバキュロウイルス中で同時に発現させ、集合させることができる。同時に発現させたキメラタンパク質は、それぞれ、少なくとも一つの特異的細胞シグナルを与える、挿入された異種ペプチドセグメントを含む。

【0039】

ペプチドをコード化する配列の大きさを最大のものは約300塩基対であり、それによって約100個のアミノ酸から成る外来または異種ペプチドセグメントが挿入される。キメラコートタンパク質遺伝子のこの領域の配列組成は次の通りである：

5' CGA A C T G G T G G C T G G... (n) - 3' ... A T C T G T T G C A A C G G 3'

配列中、オリゴヌクレオチドの5'末端および3'末端の15個の塩基はRNA2のメッセージ鎖配列の629-643および644-658塩基を補完し、(n) - 3'...は、発現されるべきペプチドセグメント配列をコード化する約300個のヌクレオチドの鎖を表す。

【0040】

1個の粒子にはコートタンパク質のコピーが180個あるので、1個の粒子表

面に発現する可能性がある異なるエピトープの最大理論数 N は $N \leq 180$ である。しかし実際に行う場合は、個々のエピトープの分子量が、十分な免疫応答を誘発するのに必要な最小限の限界値より小さくならないように、1個の粒子表面に存在する異なるエピトープの数を $N \leq 30$ （すなわち、1個の粒子表面の異なるエピトープの数は6より多くしない）に制限するのが技術的に有利かもしれない。

【0041】

翻訳後の系に変更があると抗原性に影響があるかもしれないが、挿入を制約する要因は大きさ以外にはないように見える。コートタンパク質は、グリコシル化のシグナルまたはジスルフィド結合を持たないのに対して、ウイルスが増殖可能な昆虫の細胞系統、たとえばその中でバキュロウイルスが発現される昆虫細胞系統は、哺乳動物で見られるのと非常によく似たやり方で翻訳後にタンパク質を修飾する。後記の実施例では、本発明に制限を加えるものではないが、グリコシル化部位またはジスルフィド結合が形成されることが期待されるシステインを持たないエピトープが選択された。しかしそれでも、この系は適切な抗原性のために必要なこのような翻訳後の変化を要求するエピトープに有効である。また、エピトープが挿入されていて、細菌系に翻訳後にタンパク質を変更する能力がなければ、翻訳後の変化を要求しないキメラを作りだすのに細菌の発現系を使用することもできる。

【0042】

キメラコートタンパク質遺伝子の分子の構築物は、一本鎖プラスミドDNAが関与する変異誘発によって実現することが可能である（Kunkel, T. A., 1985. PNAS 82:488-492; Kunkel, T. A., Roberts, J. D. および Zakour, R. A. 1987. Meth. Enzymol. 154:367-382）。この反応図式はオリゴヌクレオチド内に所望の配列変化を合成し、それから、オリゴヌクレオチドを使って一本鎖環状DNA鋳型上で *in vitro* の合成を開始することによって、これを生物学的に活性な環状DNA鎖に変換することによって特異的に変えることが可能なDNA配列を含んでいる。

【0043】

上で述べたように、一本鎖プラスミドDNAオリゴヌクレオチドが関与する一段階突然変異誘発の限界が明白になった場合、約100個の塩基より長いプライマーを発生させようとする時、約100個の塩基より大きな挿入部を作る分子遺伝学の技術に習熟した当業者であれば他の分子的方法を使用することが可能である。

【0044】

3個のプライマー、すなわち、突然変異部位の上流および下流領域をアニールする2個の隣接しているプライマーと1個のを必要とするPCR法に基づく技術を使用することができる。変異誘発が行われ、そのたびに突然変異誘発が変化する間、上流プライマーおよび下流プライマーは一定に保持される。修飾には置換、除去および挿入の突然変異誘発が含まれる。部位に向けられるメガプライマー法による突然変異誘発は、800bpより長いメガプライマーで成果を上げている(Sarkar, G及びS. S. Sommer, 1990. BioTechniques 8:404-407; Picard, V. E. ら, 1994. Nucleic Acids Res. 22:2587-2591)。FHVコートタンパク質のcDNAクローンのこの領域に突然変異を起こさせるには最大約700個の塩基対を含むメガプライマーが必要である。

【0045】

遺伝子に挿入突然変異を誘発するには、PCR法に基づく技術を使用することができ、4個のプライマー、すなわち、適当な制限部位を持ち、突然変異部位の上流および下流をアニールする、遺伝子の5'末端および3'末端で重合を開始させる2個のフランキングプライマーと2個の突然変異誘発プライマーを必要とする。変異誘発が行われ、そのたびに突然変異誘発が変化する間、上流プライマーおよび下流プライマーは一定に保持される。各突然変異誘発プライマーのおよそ15-20塩基は野生型配列を補完し、残りは挿入配列を表す。

【0046】

この特殊な反応図式では、分子生物学の原理に従って、FHV野生型配列を補完する5' PCRプライマーと、挿入配列のすぐ近位に位置するFHV野生型配

列を補完する、15-20塩基を有する3'プライマーとを反応させる。第2の反応では、分子生物学の原理に従って、挿入配列の補完配列のすぐ遠位に位置するFHV野生型配列を補完する、3'PCRプライマーが使用される。これら2つのPCR増幅は別々に行われ、生成したPCR産物は一旦精製して、第3回目のPCRにかける。この第3回目のPCRでは、両PCR産物と、野生型配列を補完する5'フランキングプライマーおよび3'フランキングプライマーとを一緒に合わせた。この第3回目のPCRでは突然変異誘発プライマーは使用しなかった。この最終PCRの最初のサイクルで挿入配列とその補完配列をアニールさせ、完全なキメラの鋳型を作る。この鋳型は後続のPCRで増幅される。すべての反応で使用された典型的な条件を挙げれば、以下の通りである：

サイクル1： 94°Cで3分間変成させる。

【0047】

サイクル2-30： 94°Cで1分30秒間変成させる。

【0048】

53°Cで1分間アニールさせる。

【0049】

72°Cで2分間延伸する。

【0050】

サイクル31： 72°Cで7分間延伸する。

【0051】

サイクル32： 精製し分析を実施するまで4°Cで保管する。

【0052】

PCRを行っている間に発生する配列の変化は、突然変異誘発プライマーによって導入されるものに限定するため、校正機能を持つ、熱に安定なDNAポリメラーゼ、たとえば、Pfuポリメラーゼが使用される (Marini, F. III 他, 1993. Nucleic Acids Res. 21:2277-2278)。このようなポリメラーゼには、通常、増幅DNA産物の3'末端に非鋳型塩基の付加を引き起こす末端トランスフェラーゼ活性を持たないという別の利点もある。望ましくない配列変化が起こる可能性をさらに減らすため、PCR

のサイクル数は最小限にとどめられる。次に、PCR最終産物を精製し、それからサブクローン化したのち、所望の突然変異が起きているか検査する。

【0053】

キメラを作る分子遺伝学の技術に習得した当業者であれば、これらのキメラの調製にPCR法に基づく他の挿入突然変異誘発法を使用することもできる。

【0054】

好ましい発現系：バキュロウイルス発現系

FHV様の粒子は、バキュロウイルス発現系を使用してFHVコートタンパク質キメラ遺伝子を発現させることによって作り出された (Vlak, J. M. およびKeus, R. J. A. 1990. 「ウイルスワクチン (Viral Vaccines)」、Wiley-Liss, Inc., New York, p91-128; O'Reilly, D. R., Miller, L. K. およびLuckow, V. A. 1992. 「バキュロウイルス発現ベクター 実験マニュアル」 (Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual). W. H. Freeman and Co., New York)。これによって、生化学的に精製され、*in vitro*および*in vivo*でワクチンとしての適格性を検査するために調製されるキメラ粒子の大量生産が可能になる。典型的な調製によれば、感染させたSf9細胞 6×10^9 個当たり1-2mgが得られる。T. ni. 細胞の収量は感染細胞 10^9 当たり50mgを超えることが可能である。

【0055】

キメラノートタンパク質アルファをコード化するFHV RNA2のcDNAを多角プロモーターの支配下に置き、相同的組み換えによってバキュロウイルスゲノムに挿入する。異種系で発現させたコートタンパク質のmRNAは、標準FHV RNA2を包含する1400個の塩基よりかなり長い。その理由は、RNA2の配列が、フランキング正多面体配列によって与えられる真核転写終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルを欠いていることにある。野生型の最終転写体は、約2100個の塩基の長さから成り、真正FHV RNA2には存在しな

いポリ (A) の尾を含む。この系は、RNA 1が存在しないで、かなり大きなRNA 2が存在する時に発現されるコートタンパク質が、結晶学的な分析に適する粒子に集合しうるかどうかを判定するのに広く検査されてきた。予想される通り、カプシドタンパク質は、自発的に集合して、コートタンパク質のmRNAをもパッケージングするウイルス様の粒子を形成する。これらの研究は、FHVゲノムの複製に必要なRNA 1が、ビリオンの集合には必ずしも必要ないことを明らかにしている。

【0056】

従って、FHVキメラを製造するのにバキュロウイルス発現系を使用すれば、RNA 1を使用する必要はない。本発明では、RNA 2：VSVキメラコートタンパク質を構築し、バキュロウイルス系に導入した。従って、粒子にはRNA 2：VSVキメラRNAのみがパッケージングされる。

【0057】

煩雑さを避けるため、キメラ構築物RNA 2：VSVまたはRNA 2：BRSVを表すのに、FHV：VSVまたはFHV：BRSV BRSVを使用することにする。

【0058】

本明細書で論じたように、キメラコートタンパク質とその結果生じる粒子を生成させる最適な方法は、バキュロウイルス発現系を利用する方法である。この方法によればバキュロウイルス系によって複製機構が提供されるため、FHV複製酵素を準備する必要がなくなる。

【0059】

FHV様のキメラ粒子を作り出すには別の方法を使用することもできる。たとえば、異種カプシドタンパク質RNAを発生させ、それから植物系の接種することによって、あるいはRNAで多くのほかの細胞をトランスフェクトすることによって、キメラタンパク質を作り出すことができる。こうした代替系はFHVが複製できるかどうかにかかっており、これらの代替系では、まだ最終的な結論に至ってはいないが、挿入部位が推定されている受容体の結合部位に近接している可能性があるため、程度はともかくとして、複製が妨げられるかもしれない。

【0060】

別の方法として、FHVのキメラカプシドタンパク質cDNAのコピーを含む特別なプラスミドを、ここで論じたのと同様な方法で構築することができ、それ自身の複製に向ける転写物を作ることができる。上流プライマにファージポリメラーゼプロモータを組み込むことによって、PCRで生成したDNAを、あらかじめサブクロニングすることなしに、*in vitro*でRNAを転写するための鋳型として直接使用することができる。複製酵素転写物が正常な活性度レベルを有し、そしてその粒子が、細胞受容体への結合を通して特に宿主細胞を複製することができれば、この方法はキメラノダウイルスタンパク質の高い力価を生み出す。

【0061】

制限を加えないこれらの例では、遺伝子組み換えFHVキメラコートタンパク質構築物が作製された。各種ウイルスから作られた明確なエピトープを下記表3に示す。

【0062】

【表3】

表3 キメラコートタンパク質構築物

| ウイルスエпитープ | 文献 |
|--|--|
| 小泡性口内炎ウイルス(VSV) G糖タンパク質 ウイルス株:ts-045VSV インディアナ血清型 B細胞エピトープ Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asu Arg Leu Gly Lys (配列番号: 1) | Kreis, T.E. (1986) EMBO J. 5:931-942 Kolodziej, P.A. & Young, R.A., (1991) Methods Enzymol. 194:508-519 |
| ウツ呼吸器細胞合胞体ウイルス(BRSV) F糖タンパク質 ウイルス株:RB94 接触B細胞エピトープおよびT細胞エピトープ Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln (配列番号: 2) | Walravens ら(1990) J.Gen.Virol. 71:3009-3014 Bourgeois ら(1991) J.Gen.Virol. 72:1051-1058 |
| ヒト呼吸器細胞合胞体ウイルス(RSV) F糖タンパク質 ウイルス株:RSS-2(亜型A) 接触B細胞エピトープおよびT細胞エピトープ Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln (配列番号: 3) | Walravens ら(1990) J.Gen.Virol. 71:3009-3014 Bourgeois ら(1991) J.Gen.Virol. 72:1051-1058 |
| ヒト呼吸器細胞合胞体ウイルス(RSV) F糖タンパク質 ウイルス株:18537(亜型B) 接触B細胞エピトープおよびT細胞エピトープ Asp Lys Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln (配列番号: 4) | Walravens ら(1990) J.Gen.Virol. 71:3009-3014 Bourgeois ら(1991) J.Gen.Virol. 72:1051-1058 |
| ヒト呼吸器細胞合胞体ウイルス(RSV) ウツ呼吸器細胞合胞体ウイルス(BRSV) F糖タンパク質 ウイルス株:RSS-2(亜型A)(RSV) 18537(亜型B)(RSV) RSS-2(亜型A)(BRSV) T細胞エピトープ Phe Pro Ser Asp Glu Phe (100%配列保存) (配列番号: 5) | Walravens 他(1990) J.Gen.Virol. 71:3009-3014 Bourgeois ら(1991) J.Gen.Virol. 72:1051-1058 |
| B型肝炎ウイルス(HBV) preS2 残基 132-145 B細胞エピトープ Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly (配列番号: 6) *下記エピトープで作 られた二重キメラ | Neurath, A.R., 他 1986. Vaccine 4:35. Itoh, Y., 他 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:9174. |
| B型肝炎ウイルス(HBV) HBsAg 残基 178-204 重なるThエピトープとCTLエピトープ Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe (配列番号: 7) | Franco, A., Guidotti, L.G., Hobbs, M.V., Pasquetto, V., 及び Chisari, F.V. 1997. J. Immunol. 印刷中 Greenstein, J.L. ら 1992. J. Immunol. 148:3970. |

【0063】

本発明のノダウイルス系も、治療用mRNA分子を細胞特異的に標的輸送する

ことができる遺伝子輸送ベシクルとして開発されている。要約して述べれば、前に指摘したように、そして同じ指標とパラメーターを使い、標的細胞特異性を有するキメラ粒子を作り出すコートタンパク質遺伝子の同じ領域にリガンドを挿入する。

【0064】

このパッケージング・シグナルを治療目的の遺伝子にグラフトすると、ハイブリッドRNA分子が優先的に各キメラ粒子内にパッケージングされる。コートタンパク質遺伝子にリガンドを組み込んだcDNAと、パッケージング・シグナルにグラフトさせた治療遺伝子を含む別のハイブリッドcDNAとを含む二連または三連のバキュロウイルス発現ベクターを使用するため、バキュロウイルスの発現で生じるキメラ粒子は、その表面および内部の目的の治療遺伝子上にリガンドを含んでいる。そして、パッケージング・シグナルは、パッケージング・シグナルと、粒子の内部に露出された特異的なコートタンパク質残基との間のRNA-タンパク質間相互作用を通して、遺伝子を粒子の内部につなぎ止めるようにしか作用しないため、遺伝子配列の3'末端の下流に置かれる。

【0065】

遺伝子輸送の実施形態は、エンカプシデーション・シグナルとの関連に基づいて選択的にエンカプシデーションされてきた、表面および内部の治療的な興味のある遺伝子のmRNA上にリガンドを有するウイルス様粒子を作る能力に関係している。

【0066】

このような系は、表面にあつて、RNA 2 mRNAのコピーを含むリガンドと、選択された異種遺伝子と連結するRNA 2エンカプシデーション・シグナルを含むポリヌクレオチドとから成る粒子を特徴としている。

【0067】

通常のバッキングは粒子上に制約されるため、内包されるポリニュークレオチドの大きさは約4,500塩基に制限される。野生型の粒子は普通、1,400塩基の野生型RNA 2コートタンパク質mRNAの1つのコピーと約3,100塩基のRNA 1ポリメラーゼmRNAの1つのコピーを含んでいる。細胞培養系

ではRNA 1を省略することができるため、RNA 2からの完全な形のエンカプシレーション・シグナルを有するものであれば、粒子は、それを優先的にパッケージングすることができる。もし、エンカプシレーション・シグナルの領域を貫通する正常な配列とリガンドのための挿入配列を含むキメラRNA 2コートタンパク質遺伝子が、治療目的の遺伝子にグラフトされたRNA 2エンカプシレーション・シグナルのみから成る第2の構築物と一緒に昆虫の細胞にトランスフェクトされると、生成された粒子は、キメラRNA 2 mRNA (約1,400塩基) およびRNA 2エンカプシレーション・シグナル：治療遺伝子のコピーそれぞれ1つを含むことになる。かくして、パッケージングシグナルはわずか約30塩基であるため、治療遺伝子の最大サイズは約3,100が可能である。

【0068】

別の実施形態では、複製が必要がなく、従って、RNA 2コートタンパク質mRNAはパッケージングされる必要がないため、もし保存的な塩基変化がリガンドを含むRNA 2 cRNAのエンカプシレーション領域に導入されると、粒子は集合するが、RNA 2 エンカプシレーション・シグナル：治療遺伝子mRNAのみをパッケージングし、RNA 2キメラコートタンパク質mRNAはパッケージングしない。その理由は、後者の場合は基部のループ構造が壊れてしまっているからである。かくして、基本的には、治療遺伝子産物を表すメッセンジャーセンスRNAの約4,500塩基(4.5kB)を各粒子に満たすことが可能である。これらは、取り込みと粒子の脱外皮が行われる時に細胞リボソームに翻訳にすぐ使用できる。以前の研究から、転写物の5'末端が先ず放出され、リボソームによる速やかな翻訳が可能になることが明らかにされている。

【0069】

治療目的の遺伝子をエンカプシレーションする能力は、B細胞エピトープまたはT細胞エピトープをコードするmRNAをエンカプシレーションにも適合する。特に、T細胞エピトープをコードするmRNAを翻訳する能力によって、T細胞ペプチドが細胞に導入される。そこでは、T細胞ペプチドが、内因性の古典経路に従って処理され、クラスIによる制限を受けながら提示される。

【0070】

RNA 2 エンカプシデーション・シグナル：アンチセンス鎖を容易に作り出すことができ、一度サイトゾルが放出されるとアンチセンスの原理に従って働きうる各粒子の内部にアンチセンス鎖を4,500塩基までパッケージングすることができるため、遺伝子輸送系をアンチセンス技術を適合させるのにも使用することができる。リボザイム技術は、リボザイム触媒中心をアンチセンスRNAに組み込むのに使用することもでき、標的RNA基質を部位特異的に開裂する能力を創生する(Rossi, J. J. 1995. TIBTECH 13:301-306)。

【0071】

実施例1

水疱性口内炎ウイルス(VSV) G糖タンパク質B細胞エピトープTyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys (上記の表3、配列番号:1)を含むキメラノダウイルス・カプシドタンパク質を生成した。これまでの研究で、このエピトープに対する抗体はVSV-Gの輸送に干渉することが明らかにされている(Kreis, T. E. 1986, EMBO J. 5:931-941)。このエピトープをFHVコートタンパク質遺伝子に組み込み、その後キメラ粒子を使用して*in vivo*での抗原応答を明らかにした。

【0072】

これらのキメラコートタンパク質遺伝子の分子レベルでの構築は、一本鎖プラスミドDNAのオリゴヌクレオチド媒介の突然変異誘発によって実施した(Kunkel, T. A. 1985, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, PNAS 82:488-492; Kunkel, T. A., Roberts, J. D. 及びZakour, R. A. 1987, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Meth. Enzymol. 154:367-382)。この反応図式は、オリゴヌクレオチド内に所望する配列変化を合成し、次いで、当該オリゴ

ヌクレオチドを使用して一本鎖環状DNA鋳型上で*in vitro*合成を開始させることにより、生物学的に活性な環状DNA鎖に転換して、特異的に変化させることができるDNA配列を含む。

【0073】

M13ファージをウリジンの存在下で増殖させて、ウリジンを含むssDNA鋳型を作製した。次に突然変異誘発プライマーをアニールして鋳型DNAにし、次にT7 DNAポリメラーゼでプライマーを伸長して連結し、生成物を環状にした。それにより、1本の鎖がオリジナルの鋳型であってウリジンを含み、2番目の鎖が突然変異体であってウリジンを含まない、二重鎖のDNAが創造される。このDNAをDH5 α F'細胞にトランスフェクトすると、ウリジンを含まない突然変異体鎖の選択重複を導く。形質転換細胞を非形質転換細胞のローンに塗布すると、発現するブラックの約70%が突然変異が誘発された配列を含む。

【0074】

形質転換とファージの増殖に使用した細菌株は、Life Technologies (Gaithersburg, MD) からの大腸菌DH5 α F' [F' f80dlacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 hsdR17 (r_k -, m_k +) supE44 l thi-1 gyrA96relA1] であつた。ウリジンを含むM13鋳型DNAの増殖には、Invitrogen Corporation (San Diego, CA) からの大腸菌B313/P3 [Hfr PO45 lysA dut ung thi-1 recA spoT1 {P3:Kan^R Amp^R (am) Tet^R (am)}] を使用した。Life Technologies (Gaithersburg, MD) から入手したM13mp18ファージDNAにクローン化した配列に関して突然変異誘発を行った。

【0075】

プラスミドp2BS (+) -wtを部位特異的突然変異誘発実験のための出発物質として使用した。このプラスミドは、RNA2遺伝子のコード領域全体を含む1,400塩基対の配列がクローン化された修飾pBluescript (+) (Stratagene; San Diego, CA) であつた。RNA2コ

ード配列を、最初にその一部を pBlue script-KS (+) にサブクローニングすることによって M13mp18 にクローニングした。RNA 2 配列はヌクレオチド 124 にユニーク Acc I 部位、3' 末端 (ヌクレオチド 1, 400) に Xba I 部位を含み、これらは以前に構築されている。この 1, 276 bp 断片を pBlue script-KS (+) の Acc I と Xba I 部位にクローニングして、挿入配列の 5' 末端に Acc I 部位に隣接する Kpn I 部位を持つプラスミドを生成した。次に当該配列を Kpn I と Xba I で切り出して、M13mp18 複製型 (RF) DNA の対応する部位にクローニングした。生じた M13mp18:RNA 2-Acc I/Xba I クローンにおいて、ファージ DNA の (+) 鎖は RNA 2 遺伝子の伝達鎖 (mRNA) 配列を含む。

【0076】

M13mp18:RNA 2-Acc I/Xba I ファージ株を、1 個のファージブランクを LB 肉汁 1 ml にとって生成した。ウリジンを含む M13mp18:RNA 2-Acc I/Xba I ssDNA を作製するため、中間対数増殖期にある BW313/P3 細胞の 5 ml 培養を M13mp18:RNA 2-Acc I/Xba I ファージ株 100 μ l と共に LB 肉汁 100 ml に加えた。培養物を強く振とうしながら 37℃ でひと晩インキュベートした。5,000 \times g で遠心単離機にかけて細菌細胞をペレット化し、1/4 容の 15% ポリエチレングリコール (PEG 8000)、2.5M NaCl を加えて氷上で 1 時間冷却し、5,000 \times g で 15 分間遠心単離して、上清からファージを沈澱させた。沈澱したファージを 5 ml の 10mM Tris HCl、1mM EDTA、pH 8.0 に懸濁し、1 時間氷上に放置し、その後再び 5,000 \times g で 30 分間遠心単離してデブリを取り除いた。上清を等容のフェノール/クロロホルムで 2 回抽出し、エタノール沈澱させて、100 μ g/ml で水に懸濁した。

【0077】

カプシドタンパク質の RNA 2 一次アミノ酸配列のアミノ酸 207 と 208 をコードする塩基の間に種々のペプチドコード配列を挿入するため、変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。変異誘発プライマーは、発現するペプチドをコードする介入中央配列と共に、挿入部位のどちらかの側に RNA 2 伝達鎖

配列に相補的な15塩基を含んだ。現在まで、ペプチドコード配列は78塩基対に達し、全体の長さが108塩基対で、26アミノ酸のペプチド挿入部を持つ変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーを生成した。プライマーの配列組成物は次の通りであった：

5' CGA A C T G G T G G C T G G... (N)₇₈... A T C T G T T G C A A
C C G G 3'

オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端の15塩基は、p2BS(+)-wtにおけるRNA2伝達鎖配列の塩基629-643及び644-658に相補的であり、(n)₇₈は発現すべきペプチド配列をコードするヌクレオチドの数である。

【0078】

すべての実験において変異誘発オリゴヌクレオチド対ssDNA鋳型の分子比は10:1とした。代表的な反応は、M13mp18:RNA2-AccI/XbaI:ssDNA 1μgを使用し、従ってプライマーの長さに応じて100-200ngのプライマーが必要であった。1回の反応に十分な量のプライマーを、70mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、5mM DTT、2mM ATP、pH7.6中で10U T4ポリヌクレオチドキナーゼと共に20μlの容量として37℃で60分間インキュベートしてリン酸化した。EDTAを加えて15mMとしてキナーゼ反応を停止させ、その後70℃で3分間インキュベートした。

【0079】

リン酸化したプライマーを鋳型DNAにアニールするため、10xSSC(10xSSCは1.5M NaCl、0.15M Na₃CitrateH₂O、pH7.0である)をM13mp18:RNA2-AccI/XbaI:ssDNA 1μgと共にキナーゼ反応混合物に加えて、容量を40μlに調整した。混合物を95℃の500ml水浴に沈水し、水浴を室温までゆっくりと冷却させてプライマーをアニールした。

【0080】

アニールした突然変異誘発プライマーをT7 DNAポリメラーゼで伸長し、

T4 DNAリガーゼで環状にした。合成とライゲーションは、プライマー-鋳型アニーリング混合物、20 mM Tris HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、2 mM ジチオトレイトール、2 mM ATP、1 mM dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、0.1 mg ウシ血清アルブミン、10 U T7 DNAポリメラーゼならびに3 U T4 DNAリガーゼの全体を含めて100 μ l 容量で同時に実施した。37℃で2時間インキュベートして、EDTAを加えて15 mMとし、反応を停止させた。

【0081】

各反応物の20 μ l アリコートをして1.0%アガロースゲル中でのゲル電気泳動によって分析した。成功した反応物は、基本的にすべてのssDNA鋳型DNAを高分子量の二本鎖複製型DNAに転換させた。

【0082】

プライマー伸長反応からの残りの産物をエタノール沈澱させ、乾燥して、水10 μ lに懸濁した。コンピテントDH5 α F'細胞を製造者のプロトコールに従って懸濁反応産物混合物1 μ lで形質転換した。形質転換細胞を製造者の勧めに従ってDH5 α F'細胞のローンに塗布し、プレートをして37℃でインキュベートした。ファージプラークは12時間以内に可視となった。

【0083】

突然変異が誘発されたクローンを同定し、DNA塩基配列分析によって確認した。単一ファージのプラークを単離し、上述したようにssDNAを作製した。T7 Sequenase v2.0 (Amersham Life Science; Cleveland, OH)を使用して、製造者のプロトコールに従ってDNAを塩基配列決定した。ウリジンを含む鋳型DNAに対する生物学的選択は非常に強く、突然変異株の回収効率は代表的に70%以上であった。

【0084】

二本鎖複製型(RF)DNAからサブクロニングするために、選択クローンからの変異体化配列を回収した。ssDNAを単離するため、ファージ感染したDH5 α F'細胞を上記したように増殖させ、塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配遠心単離によるプラスミドの単離とバンド染色のための標準プロトコール

に従って、細胞ペレットをRF単離用に処理した。

【0085】

RF DNAをAcc IとXba Iで消化し、この時点で挿入配列を担う、生じたRNA 2断片をp2BS (+) -wt中の最初のAcc I/Xba I部位に再びサブクロニングした。すべての分子構築物を、発現の前に完全なDNA塩基配列決定と分析に供した。

【0086】

次に標準的な発現と確認手順を用いて (Vlak, J. M. とKeus, R. J. A. 1990, In Viral Vaccines, Wiley-Liss, Inc., New York, p. 91-128; O'Reilly, D. R., Miller, L. K. とLuckow, V. A. 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Co., New York)、極めて効率的なバキュロウイルス発現系においてFHVキメラコートタンパク質遺伝子を発現させた。バキュロウイルス発現系は組換えタンパク質を生成するのに特に効率的な系であることが認められている。通常、総昆虫タンパク質の0.1%から50%の範囲のレベルで組換えタンパク質が生成される。さらに、バキュロウイルス発現系は昆虫細胞内で、代表的には生物学的に活性な異種タンパク質を形成するために必要とされるプロセッシング事象の大部分を実施することができる。

【0087】

野生型あるいはキメラコートタンパク質 α のいずれかをコードするFHV RNA 2のcDNAをバキュロウイルス多角体プロモーターの制御下におき、相同組換えによってバキュロウイルスゲノムに挿入した。非相同系において発現されるコートタンパク質のmRNAは、標準FHV RNA 2を含む1,400塩基よりも長い。これは、RNA 2の配列が、隣接多角体配列によって供給される真核性転写終止及びポリアダニル化シグナルを欠くためである。最終的な野生型転写産物は約2,100塩基の長さで、標準FHV RNA 2には存在しないポリ(A)テールを含む。この系は、RNA 1の不在下及び有意に大きなRNA 2の

存在下で、高収率で粒子を生成する (Schneemann, A. ら、1993, J. Virol. 67:2756-2763)。

【0088】

RNA2 cDNAを野生型線形Autographa californica単核多角体ウイルス (AcMNPV) と共に 2×10^6 S. frugiperda細胞の単層にコトランスフェクションすることにより、キメラFHVコートタンパク質cDNAを含む組換えバキュロウイルスを生成した。細胞をTMN-FH培地1ml (Pharmingen, San Diego, CA) でおおった。RNA2 cDNAとバキュロウイルスDNAをリポフェクチン $30 \mu\text{g}$ 中で混合し、総容量 $100 \mu\text{l}$ とした。このトランスフェクション混合物を、細胞をおおう培地1mlに滴下した。27℃で4時間インキュベートしたあと、培地を取り出し、新鮮TMN-FH培地と交換した。プラーク精製を数回繰り返して単組換えウイルスを単離した。単離した組換え体を 10^8 pfu/mlを越える力価まで増幅した。

【0089】

目的のエピトープを含むFHVキメラ粒子を感染後4-7日目の組換えバキュロウイルス感染細胞から精製した。0.5% NP-40と0.1% 2-メルカプトエタノール (2-ME) の存在下で細胞を溶解した。氷上で15分間インキュベートした後、細胞デブリをBeckman GS-15R遠心単離機において10,000 rpmでペレット化した。上清を27℃で30分間、 $10 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度のRNase Aで処理し、次いで10,000 gで遠心単離して微粒子物を除去した。生じた上清は粒子を含み、これを50 mM Hepes (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸) (pH 7.0)、0.1% 2-ME及び0.1% ウシ血清アルブミンを含む30% (w/w) スクロースクッションに重層した。Beckman JS24.15ローターにおいて100,000 g、7℃で2時間半、スクロースクッションを通して粒子をペレット化した。上清を取り除き、ウイルス粒子を含むペレットを50 mM

Hepes及び0.1% 2-MEに懸濁した。上清を10-40% (w/w) 線形スクロース勾配15 mlに重層し、JS24.15ローターにおいて100

、000 g、7℃で1時間半沈澱させた。分析収量に関しては、勾配をISCO勾配精留塔で0.75 ml/分及び0.5分/画分で分別した。光学密度によって測定したウイルス粒子を含む画分を4℃で、あるいは-20℃で凍結して保存した。より大きな収量については、分画を必要としなかった。その代わりに、遠心単離後、勾配の上方1/3にウイルスバンドが認められた。注射器に接続した18ゲージの針を用いて管に穿刺し、ウイルス分画を回収した。

【0090】

SF9あるいはT. ni. 細胞での非常に大きな収量については、感染後7日目の組換えバキュロウイルス感染細胞から、目的のエピトープを含むFHVキメラ粒子を精製した。0.5% NP-40と0.1% 2-MEの存在下で細胞を溶解した。氷上で15分間インキュベートした後、細胞デブリをBeckman GS-15R遠心単離機において10,000 rpmでペレット化した。生じた最終濃度8%の上清とNaClにポリエチレングリコール8,000 (PEG 8,000)を加えて最終濃度0.2Mとした。懸濁液を氷上で1時間混合し、その間にPEG 8,000を溶解した。

【0091】

混濁した懸濁液を14,000 gで10分間遠心単離し、ペレットをHepes緩衝液(pH 7.0) 20 mlに懸濁した。14,000 gで20分間遠心単離して不溶性物質を除去した。上清を回収し、保存した。PEGペレットをHepes緩衝液20 mlのアリコートにさらに2回懸濁し、その後遠心単離機にかけた。上清を貯留し、10-40% (w/w) 線形スクロース勾配に重層し、上述したように精製した。

【0092】

スクロース勾配から単離した粒子を50 mM Hepes (pH 7.0)と0.1% 2-MEで4倍希釈し、JS24.15あるいは同等のローターにおいて100,000 g、7℃で16時間、Hepes (pH 7.0)及び0.1% 2-ME中15 mlの20-45% (w/w) CsCl勾配を通してペレット化する、任意の追加精製段階も使用できる。

【0093】

単離した粒子をHepes緩衝液(pH 7.0)中で広汎に透析し、スクロースあるいはCsClを除去した。動物で試験するためのバッチをフィルター滅菌し、-20℃で保存した。

【0094】

2つの主要な方法によってノダウイルスキメラ粒子の分析を行った。1つの方法は、目的の特定タンパク質を検出するために免疫化学的試薬を用いるウエスタンブロット法によるものである。新たに合成した180コピーのコートタンパク質分子は数分以内に集合して、プロビリオンと呼ばれる不安定な前駆物質粒子となる。この集合過程が引き金となって、未熟なコートタンパク質を2つのより小さな分子に開裂する自発的化学反应が起こる。これら2つの小さな分子は成熟ビリオン(ウイルス粒子)の一部である。43kDaバンド(未開裂)、38kDaバンド(β)及び5kDaバンド(γ)が存在することは、粒子が集合したことを示す。数日後、未開裂物質の大部分が消失し、その時点では38kDaと5kDaの主要バンドだけが検出可能である。これまでの研究の多くが、この開裂過程は集合した粒子においてだけ起こることを示している(Gallagher, T. M. とR. R. Rueckert, 1988, J. Virol. 62:3399-3406; Schneemann, A. ら、1992, J. Virol. 66:6728-6734)。

【0095】

バキュロウイルス系で生成されたFHV:VSVキメラをウエスタン法で分析した。RNA2:VSVを含む組換えバキュロウイルスに感染したSf細胞からのタンパク質を単離し、標準SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって単離して、カプシドタンパク質と所望するペプチドに対する抗体を用いて免疫ブロット法で分析した。正常なFHV配列に対する抗体はこれらのバンドを検出し、挿入配列に対する抗体はコートタンパク質のコンテキスト内でそれぞれの挿入エピトープを検出する。これらの免疫化学的実験は、開裂産物がすべて存在し、それらは導入配列のために正常なものよりもわずかに大きいことを明らかにし、またキメラ粒子が集合したことを確認する。

【0096】

もうひとつの確認方法では、キメラウイルス様粒子を、その一般的な幾何構造と大きさを調べるために透過型電子顕微鏡を使用して検討した (Harris, J. R. 1991, Electron microscopy in biology, A practical approach, The practical approach series. Oxford University Press, New York)。

【0097】

陰性染色分析のために、キメラウイルス様粒子懸濁液1滴を、白熱放電Formvarカーボン被覆の300-400メッシュ銅グリッドに適用した。1-2分して過剰の液体を一部ブロットし、その後緩衝液数滴で3回洗浄した。次にグリッドを2回適用し、0.2mmミリポアフィルターを通して濾過した1%酢酸ウラニル (Ted Pella Inc.) 水溶液1/3滴中で1分間インキュベートした。過剰の液体を一部ブロットし、グリッドを空気乾燥した。Phillips CM100電子顕微鏡において100kVで顕微鏡写真を撮影した。

【0098】

免疫電子顕微鏡用に、ウイルスキメラ粒子を一次抗体と共にインキュベートした。50mM HEPES、pH7.0中キメラウイルス0.2mg (0.4mg/mlウイルス) を抗VSV-G Mab (同じ緩衝液に溶解した) 0.012mgと共に、静かに振とうしながら4℃でひと晩インキュベートした。免疫金標識のために、抗体-ウイルス混合物1滴 (10ml) をFormvarカーボン被覆300-400メッシュ銅グリッド上に約1分間置いた。過剰分を一部ブロットし、グリッドを50mM HEPES、pH7.0中で5回洗浄し、非結合抗体を除去した。次にグリッドを6nmコロイド状Au-ロバ抗マウスIgG (緩衝液で1:10希釈) 数滴中で、室温・定常湿度で30分間インキュベートし、続いて緩衝液中で5回洗浄した。その後、試料を1%酢酸ウラニルと共に1分間インキュベートし、完全にブロットして、空気乾燥した。

【0099】

実施例2

表3に示すようなウシの呼吸器性シンシチアルウイルス (BRSV) Fタンパ

ク質からのエピトープを含むキメラカプシドタンパク質を生成した。特に、BR
SV Fタンパク質の配列、Asp Lys Glu Leu Leu Pro
Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile
Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe
Gln Gln (配列番号：2)を上記実施例1で詳述したようにFHVコー
トタンパク質遺伝子に組み込んだ。

【0100】

BRSV F糖タンパク質は感染後の免疫応答において重要な抗原であることが知られている。この配列はB細胞エピトープであることが示されており、同時に増殖性T細胞応答に必要な配列も含む (Corvaisier, C. ら、1993, Res. Virol. 144:141-150)。発現させて精製した後、抗原性を調べるため、粒子を *in vivo* でワクチンとして使用した。

【0101】

バキュロウイルス系で生成されたFHV:BRSVキメラをウエスタン法で分析した。RNA2:BRSVを含む組換えバキュロウイルスに感染したSf細胞からのタンパク質を単離し、標準SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって単離して、カプシドタンパク質と所望するペプチドに対する抗体を用いて免疫ブロット法で分析した。正常なFHV配列に対する抗体はこれらのバンドを検出し、挿入配列に対する抗体はコートタンパク質のコンテキスト内でそれぞれの挿入エピトープを検出する。これらの免疫化学的実験は、開裂産物がすべて存在し、それらは導入配列のために正常なものよりもわずかに大きいことを明らかにし、またキメラ粒子が集合したことを確認する。

【0102】

実施例3

HBVの除去は、ウイルスのエンベロープ、ヌクレオカプシド及びポリメラーゼ抗原に対する活発なポリクローン性のB細胞及びT細胞の応答に依存する。HBVに対するCTL応答は、ウイルスを清掃することができない慢性感染患者では容易に検出されない。ウイルスの除去は、付随する肝臓病を引き起こすことがある、感染肝細胞の破壊を必要とすると考えられてきたが、新しい証拠はこれが

必ずしもそうではないことを示唆している。最近の試験で、HBV特異的CTLは、感染ヒト肝において認められるレベルと同等の高レベルのHBV複製を有するトランスジェニックマウスの肝からウイルスを清掃できることが示された。これらの試験は、二次感染を引き起こすリンパ球脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）にマウスを感染させることによってHBVの細胞内不活性化を可能にした。この除去は一度感染した肝細胞を損傷することなく起こり、肝細胞は健常なHBV陰性状態にもどる。この治療作用は、CTLが活性化したときに分泌するインターフェロンガンマ（IFN- γ ）及び腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）によって媒介される。

【0103】

サイトカインは肝細胞を活性化して、細胞内で複製ウイルスのすべての痕跡を除去する少なくとも2つの治療的抗ウイルス機能を実現する。まず第一に、細胞質中に存在するHBVヌクレオカプシド粒子を解体して、ウイルスゲノムを細胞ヌクレアーゼに接触させる。第二に、ウイルスDNAを分解し、それによって新たな転写鋳型の生成と新たなウイルス粒子の集合をあらかじめ排除する。これらの事象は完全に生存可能な肝細胞において起こり、肝細胞は細胞学的に全く正常である。

【0104】

上記に述べた試験は、CTLが感染細胞を死滅させずにB型肝炎ウイルス感染を治療しうることを明らかにしている。これは、ウイルス除去が主として免疫応答の破壊の関数ではなく感染細胞の生存率の関数であることを示すものである。

【0105】

本実施例では、肝細胞特異的リガンドを担い、カプシドエンカプシデーション・シグナルを使用してパッケージングしたヒトインターフェロン γ を含むFHVキメラ粒子を（図2及び12）、遺伝子輸送系として働くことができるように有効に肝細胞に標的した。

【0106】

肝特異的リガンドは、*Plasmodium falciparum*（熱帯熱マラリア原虫）のサーカムスポロゾイトタンパク質の肝細胞膜への結合を有効に

遮断する、*Plasmodium falciparum* CSP:VIII (配列番号: 8) の配列に基づく (Ceramiら、1992, Cell, 70巻、1021-1033)。肝細胞膜に特異結合するRNA2:CSP融合タンパク質を精製する試みとして、オリゴヌクレオチド媒介の突然変異誘発を使用して、わずかに大きいCSPコード配列、IX (23アミノ酸、配列番号: 9) をFHV RNA2のアミノ酸残基207と208の間に挿入した (図12)。ひとたびこれらの集合キメラ粒子が肝細胞に導入されれば、粒子表面の肝細胞特異的分子あるいはリガンドは、肝細胞中の他の分子に直接結合する。同じ粒子は内部にIFN- γ に関するメッセージを持つので、それが肝細胞に入り込むことはインターフェロンの局所産生を生じさせる。肝細胞におけるこの局所インターフェロンはオートクリン及びパラクリンの作用して、肝細胞内でこのサイトカインのさらに多くの*in vivo*産生を活性化し、その結果細胞を死滅させずにウイルスを清掃することができる。

【0107】

実施例4

本発明の系は、長さが約100アミノ酸残基未満の他のペプチドリガンド及び約4,500塩基未満の大きさの多くの遺伝子に容易に適用できる。サイトカイン及びT細胞エピトープはこれらの候補遺伝子あるいは遺伝子断片の少数を占める。多様な医学的用途を持つ運動ニューロン標的系も同様に構築できる。上記に述べたのと同様にして、粒子表面の運動ニューロン神経終末と特異的に結合し、遺伝子輸送系を促進するリガンドが発現される。いくつかの作用依存性神経終末システムがあり、それらの作用は、神経伝達物質小胞の融合後、小胞が速やかに回復され、その過程でシナプス間隙から少量の液体を採取するという事実に基づく (Mundigl, O. 1995, Eur J Cell Biol 66:246-256)。シナプス小胞の内部にあるウイルス結合の標的は効率的である。粒子は直径約300Åで、飲食作用小胞に適合する。

【0108】

シナプス小胞ターゲティングアプローチは、粒子表面で発現されうるタンパク質AのFc抗体結合領域を含み、動物に投与する前に単に粒子を特異抗体に結合

することによって必要な抗原にターゲティングする。構造ベース設計とファージディスプレイ法を使用することにより、タンパク質Aの33残基がFc領域に結合することが認められた(Braisted A. C. とWells J. A. 1996, Proc Natl Acad Sci USA 93:5688-569)。これは、受容体を同定し、毎回新しいキメラウイルスを作製する必要を取り除く。タンパク質AのFc抗体領域を持つ同じコアキメラ粒子は、種々の抗体に複合することにより、多くの適用において使用できる。

【0109】

実施例5

ペプチドあるいはハプテンのような小さな分子は、免疫成分と相互作用することはできるが、十分に免疫原性ではない。ハプテンを免疫原性であるようにすることができる担体タンパク質に結合することにより、これらの小分子を免疫原性にすることができる。ハプテンに共有結合する、一般的に使用される担体の一部は、分子量が 4.5×10^5 から 1.3×10^7 ダルトンのキーホールリンベツト(スカシ貝)ヘモシアニン(KLH)、分子量67,000ダルトンのウシ血清アルブミン(BSA)及び分子量45,000ダルトンのオボアルブミン(OVA)を含む。

【0110】

ノダウイルス、特に分子量約 7.7×10^6 ダルトンのFHV粒子は、ペプチドが結合化学を通して共有結合している、表面の抗原ペプチドの極めて効率的な担体として機能することができる。粒子は個々のサブユニットに解離するので、抗原ペプチドはますます露出され、免疫原性となる。

【0111】

この系で使用する連結化学は、各サブユニットにつき露出された約10のアミン側鎖と7の酸側鎖が存在するという事実から生じる。これは、各粒子当たり約1,800のアミン側鎖と1,260の酸側鎖が存在することを意味する。これらの数が、それ自体で各々の粒子に多数のペプチドを結合することができる野生型粒子に適用される。挿入ループに組み込まれた付加的なアミン側鎖と酸側鎖を持つキメラ粒子は、連結に使用できる部位数を増加させるように働く。野生型粒子

上には露出したスルフヒドリル基が存在せず、そのことが効率的な連結反応図式を構築する能力を提供する。挿入ループの残基の大部分が粒子の表面でアクセス可能となる。

【0112】

この特定実施例では、ペプチドを粒子の表面に連結するためにスルホン化架橋剤を使用した。特に、本実施例ではスルホスクシニミド系架橋剤、4-(Nマレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートを使用した。この架橋剤は、スペーサーアームに結合されたNHSエステルとマレイミド基を持つ。NHSエステルは一級アミンと反応し、マレイミドはスルフヒドリルと反応する。まず最初にFHV粒子に対して50モル過剰の架橋剤をインキュベートし、室温で30分間反応を進行させてNHS反応を実施する。架橋剤の第二のアリコートを加えて架橋剤を最終的に100モル過剰にし、室温でさらに30分間反応を進行させた。Tris-HCl pH7.0を加えて0.1Mの最終濃度にしてNHS反応をクエンチングし、次いでスルフヒドリル基を含むペプチドを加えて過剰の架橋剤を除去した。NHSエステルはpH7-9で一級アミンと反応し、マレイミドはpH6.5-7.5でSH基と反応するので、架橋は有効である。Tris-HCl中の遊離アミンは残りの使用可能なNHSエステルと反応する。さらに、マレイミドは高いpHでしかNHSエステルと反応しないので、これら2つの基の相互の反応性は問題を生じない。

【0113】

先に使用したBRSVペプチド(配列番号:22)の、アミノ酸残基Cys Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Ser(配列番号:45)を持つ部分をハプテンとして使用した。合成の間にこの部分のアミノ末端のCys残基を加えて、KLHと結合させた。別の連結においては、同じBRSVペプチド部分であるがアミノ末端に付加的なCysがない部分、すなわちAsp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Ser(配列番号:46)を使用した。上記に概説した反応図式を使用して、これらのペプチドを野生型粒子ならびに

FHV:VSVキメラに連結した。次に粒子を変性してウエスタンブロット法で分析し、コートタンパク質単量体のコンテキスト内に多数のペプチドが存在することを確認した。その後連結粒子を免疫原として使用し、粒子に結合していたBRSPペプチドに対して強い免疫応答を誘発することを認めた。

【0114】

このことは、カプシドタンパク質遺伝子中に挿入部がない場合でも、粒子が有効な免疫活性化剤及び免疫調節剤として働きうることを示している。さらに、カプシドタンパク質遺伝子内に挿入配列が存在すること、ならびにハプテンを表面に結合する前にサイトカインのような他の既知の免疫活性化剤を粒子の内部にエンカプシデーションすることにより、免疫刺激因子及び免疫調節因子が増強される。

【0115】

実施例6

抗マラリア性ターゲティングのような他の治療構築物も可能である。抗マラリア治療のためには、ヒト細胞の代わりにマラリアスポロゾイト細胞を標的する、本発明の系を用いた遺伝子治療プロトコルを設計する。FHVウイルスコートタンパク質上でのCSP認識受容体部位の発現は、寄生虫がまだ血流中に存在する間にそれに結合して遮断し、それによって感染を防ぐ、あるいは毒素産生物質を寄生虫に輸送し、それによって寄生虫を破壊する。

【0116】

上記の説明は、当業者が本発明を実施し、使用できるように、本発明の完全で明瞭、簡潔且つ正確な開示を提供する。この開示は、特定して指摘され、下記に明白に特許請求される本発明の範囲にいかなる直接あるいは暗示的な限定も与えるものと解釈すべきではない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> PENTAMER PHARMACEUTICALS, INC. and THE SCRIPPS
RESEARCH INSTITUTE

<120> RECOMBINANT NODAVIRUS COMPOSITIONS AND METHODS

<130> TSRI 549.0

<140> Not yet known

<141> Not yet known

<150> 08/986,659

<151> 1997-12-08

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> chimeric protein

<400> 1

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> chimeric protein

<400> 2

Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Ser
1 5 10 15

Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln
20 25

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> chimeric protein

<400> 3

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
1 5 10 15

Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln
20 25

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> chimeric protein

<400> 4

Asp Lys Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser
1 5 10 15

Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln
20 25

<210> 5

<211> 6
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 5
 Phe Pro Ser Asp Glu Phe
 1 5

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 6
 Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 7
 Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe
 20 25

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 8
 Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Ala Asn
 20

<210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 9
 Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg
 1 5 10 15

Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn
 20

<210> 10
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 10
 Met Val Asn Asn Asn Arg Pro Arg Arg Glu Arg Ala Glu Arg Val Val
 1 5 10 15

Val Thr Thr Thr Glu Thr Ala Pro Val Pro Glu Glu Asn Val Pro Arg
 20 25 30

Asn Gly Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Val
 35 40 45
 Arg Gly Met Asn Met Ala Ala Leu Thr Arg Leu Ser Gln Pro Gly Leu
 50 55 60
 Ala Phe Leu Lys Cys Ala Phe Ala Pro Pro Asp Phe Asn Thr Asp Pro
 65 70 75 80
 Gly Lys Gly Ile Pro Asp Arg Phe Glu Gly Lys Val Val Ser Arg Lys
 85 90 95
 Asp Val Leu Asn Gln Ser Ile Ser Phe Thr Ala Gly Gln Asp Thr Phe
 100 105 110
 Ile Leu Ile Ala Pro Thr Pro Gly Val Ala Tyr Trp Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Pro Arg Gly Thr Phe Pro Thr Ser Ala Thr Thr Phe Asn Pro Val Asn
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Phe Thr Ser Met Phe Gly Thr Thr Ser Thr Ser Arg Ser
 145 150 155 160
 Asp Gln Val Ser Ser Phe Arg Tyr Ala Ser Met Asn Val Gly Ile Tyr
 165 170 175
 Pro Thr Ser Asn Leu Met Gln Phe Ala Gly Ser Ile Thr Val Trp Lys
 180 185 190
 Cys Pro Val Lys Leu Ser Thr Val Gln Phe Pro Val Ala Thr Asp Pro
 195 200 205
 Ala Thr Ser Ser Leu Val His Thr Leu Val Gly Leu Asp Gly Val Leu
 210 215 220
 Ala Val Gly Pro Asp Asn Phe Ser Glu Ser Phe Ile Lys Gly Val Phe
 225 230 235 240
 Ser Gln Ser Ala Cys Asn Glu Pro Asp Phe Glu Phe Asn Asp Ile Leu
 245 250 255
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Pro Pro Ala Asn Val Ser Leu Gly Ser Thr
 260 265 270
 Gly Gln Pro Phe Thr Met Asp Ser Gly Ala Glu Ala Thr Ser Gly Val
 275 280 285
 Val Gly Trp Gly Asn Met Asp Thr Ile Val Ile Arg Val Ser Ala Pro
 290 295 300
 Glu Gly Ala Val Asn Ser Ala Ile Leu Lys Ala Trp Ser Cys Ile Glu
 305 310 315 320
 Tyr Arg Pro Asn Pro Asn Ala Met Leu Tyr Gln Phe Gly His Asp Ser
 325 330 335
 Pro Pro Leu Asp Glu Val Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Thr Val Ala Arg
 340 345 350
 Ser Leu Pro Val Ala Val Ile Ala Ala Gln Asn Ala Ser Met Trp Glu
 355 360 365
 Arg Val Lys Ser Ile Ile Lys Ser Ser Leu Ala Ala Ala Ser Asn Ile
 370 375 380
 Pro Gly Pro Ile Gly Val Ala Ala Ser Gly Ile Ser Gly Leu Ser Ala
 385 390 395 400

Leu Phe Glu Gly Phe Gly Phe
405

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particles

<400> 11
ggaagatcta tgcaggaccc gtacgta 27

<210> 12
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particles

<400> 12
taatctgggtt agcgccgcca tgttcattta ctggctagcg cgacg 45

<210> 13
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particles

<400> 13
ggaagatcta aacgccaac caggttgact taatctgggtt agcgccgc 48

<210> 14
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 14
ccaagctcga aattaaccct cactaaagta aacaattcca agttccaaaa tgggttaa 57

<210> 15
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 15
aaaccagttt aagtcaacag actaaggtct agaggatccc egggtaccga gtcgaattc 60
gccctaagat gactcgtatt acaattcact ggc 93

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 16
 Pro Val Ala Thr Asp Pro Ala Thr Ser Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 17
 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 18
 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10

<210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 19
 Pro Val Ala Thr Asp Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Thr Ser Ser
 20

<210> 20
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: virus-like
 particle

<400> 20
 cgaactgggtg gctggcttgc ccaggcgggt catctcgatg tccgtgtaat ctggtgcaac 60
 cgg 63

<210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: virus-like
 particle

<400> 21
 cttgccccagg cggttcatct cgatgtccgt gta 33

<210> 22
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> chimeric protein

<400> 22

```

Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Ser
 1           5           10           15
Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln
          20           25

```

```

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> chimeric protein

```

```

<400> 23
Pro Val Ala Thr Asp Pro Ala Thr Ser Ser
 1           5           10

```

```

<210> 24
<211> 108
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

```

```

<400> 24
cgaactgggtg gctggttggtt ggaattctat cacagttgct atgttgata tctgacaatc 60
atgattgtta actttaggtg gaagctcttt gtcattctgtt gcaaccgg          108

```

```

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

```

```

<400> 25
cacagttgct atgttgata tctgacaatc atg          33

```

```

<210> 26
<211> 95
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

```

```

<400> 26
tcgggcgcgg atcagatctg cagcggccgc gtaacaatt ccaagttcca aaatggtaa 60
gtcaacagac taaggtctag aggtaccgg gatcc          95

```

```

<210> 27
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

```

```

<400> 27
cagcggccgc gtaacaatt ccaagttcca aaatgg          36

```

```

<210> 28
<211> 23

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 28
cctctagacc ttagtctggt gac

23

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 29
Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 30
Pro Val Ala Thr Asp Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro
1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ala Thr Ser Ser
20

<210> 31
<211> 27
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 31
Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe
20 25

<210> 32
<211> 37
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 32
Pro Val Ala Thr Asp Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile
1 5 10 15

Leu Thr Ile Pro Glu Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe
20 25 30

Pro Ala Thr Ser Ser
35

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 33
Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg

1 5 10 15

Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn
20

<210> 34
<211> 33
<212> PRT
<213> chimeric protein

<400> 34
Pro Val Ala Thr Asp Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn
1 5 10 15

Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Pro Ala Thr Ser
20 25 30

Ser

<210> 35
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

<400> 35
cgaactgggtg gctggattag cagagccagg ctttattcta acttggtatc catttccaca 60
agttacacta catggggacc attcatctgt tgcaaccgg 99

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

<400> 36
accatttcca caagttacac tacatgggga cca 33

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

<400> 37
cctcgtgcga ttacgtcggc 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

<400> 38

agctgataga ttgattgagg 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 39
tgcaggttgg gtaaataaac 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 40
ccaagggaca cattagcagg 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 41
tggtataaca tggcgtttgg 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 42
gctgacagtc cactaatacc 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like particle

<400> 43
gctgctgcaa gcaacattcc 20

<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like

```

particle
<400> 44
cacagaattc attaaagagg ag                22
<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> chimeric protein

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

<400> 45
Cys Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile
  1          5          10          15
Ser

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> chimeric protein

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: virus-like
particle

<400> 46
Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Val Asn Asn His Asp Cys Gln Ile Ser
  1          5          10          15

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

FHVコート・タンパク質サブユニットの4次構造を示す。

【図2】

いくつかのノダウイルスのRNA 2内のエンカプシデーション・シグナルを表す推定二次構造を示す。

【図3】

治療目的の遺伝子、ヒト・インターフェロン γ の末端への、FHVエンカプシデーション・シグナルのグラフト化を示す。

【図4】

p2BS (+) -wt、p2BS (+) -RNA2:VSV-G#1、p2BS (+) -RNA2:BRSV#1の末端を配列決定することにより決定された、RNA2挿入配列に直接隣接しているp2BS (+) -wt配列を示す。

【図5】

p2BS (+) -RNA2:VSV-G構築物の配列を示す。

【図6】

RNA2:VSV-G突然変異誘発プライマー及びハイブリダイゼーション

・プローブの配列を示す。

【図7】

p2BS (+) - RNA2 : BRSV構築物の配列を示す。

【図8】

RNA2 : BRSV突然変異誘発プライマーの配列を示す。

【図9】

pVL1392-RNA2バキュロウイルス発現ベクター、pVL1392-RNA2 : VSV-Gバキュロウイルス発現ベクター、及びpVL1392-RNA2 : BRSVバキュロウイルス発現ベクターの構築の概略を示す。

【図10】

RNA2構築物をpVL1392へサブクローニングするためのプライマーの配列を示す。

【図11】

p2BS (+) - RNA2 : HBV構築物の配列を示す。

【図12A】

機能的RNA2 : CSP融合構築物の構築の概略を示す。

【図12B】

機能的RNA2 : CSP融合構築物の構築の概略を示す。

【図13】

RNA2及びその他の配列決定用プライマーの配列を示す。

【図14】

コート・タンパク質に挿入されたVSVエピトープを含むキメラFHV粒子の電子顕微鏡写真を示す。エピトープを、FHV : VSVキメラ粒子を作製するための水疱性口内炎ウイルス (VSV) より得た。エピトープ Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asu Arg Leu Gly Lys (配列番号 : 1) をFHVコート・タンパク質に挿入し、バキュロウイルス発現系に導入した。パネルAは、バキュロウイルス感染S. フルギペルダ (S. frugiperda) 細胞から単離され、標準的なネガティブ染色条件を用いて電子顕微鏡にかけられたキメラ・ウイルス様粒子を示す (倍率39,000倍)。安定

的なキメラ・ビリオンの二十面体形状に注意されたい。パネルBは、バキュロウイルス感染S. フルギペルダ細胞から単離され、免疫電子顕微鏡にかけられたキメラFHV:VSVキメラ粒子を示す(倍率39,000倍)。FHV:VSVキメラ粒子は、FHVコート・タンパク質に挿入された前記の11残基VSVエピトープ(配列番号:1)に対するモノクローナル抗体P5D4(MabP5D4)で修飾されている。MabP5D4はIgG1 κ サブタイプであり、VSVエピトープへの結合が見られ、キメラ粒子に暗いハロー様の様相を与える。抗体は、IgGの存在による穏和な凝集も誘導する。

【図1】

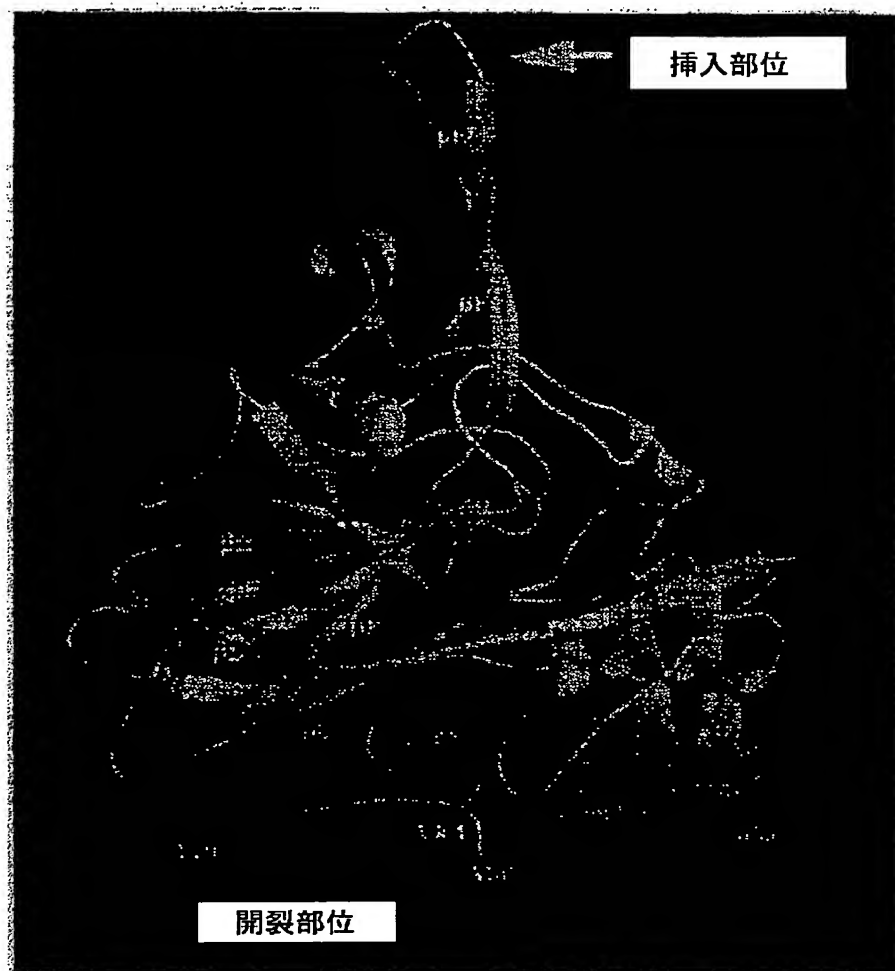


FIG. 1

【図2】

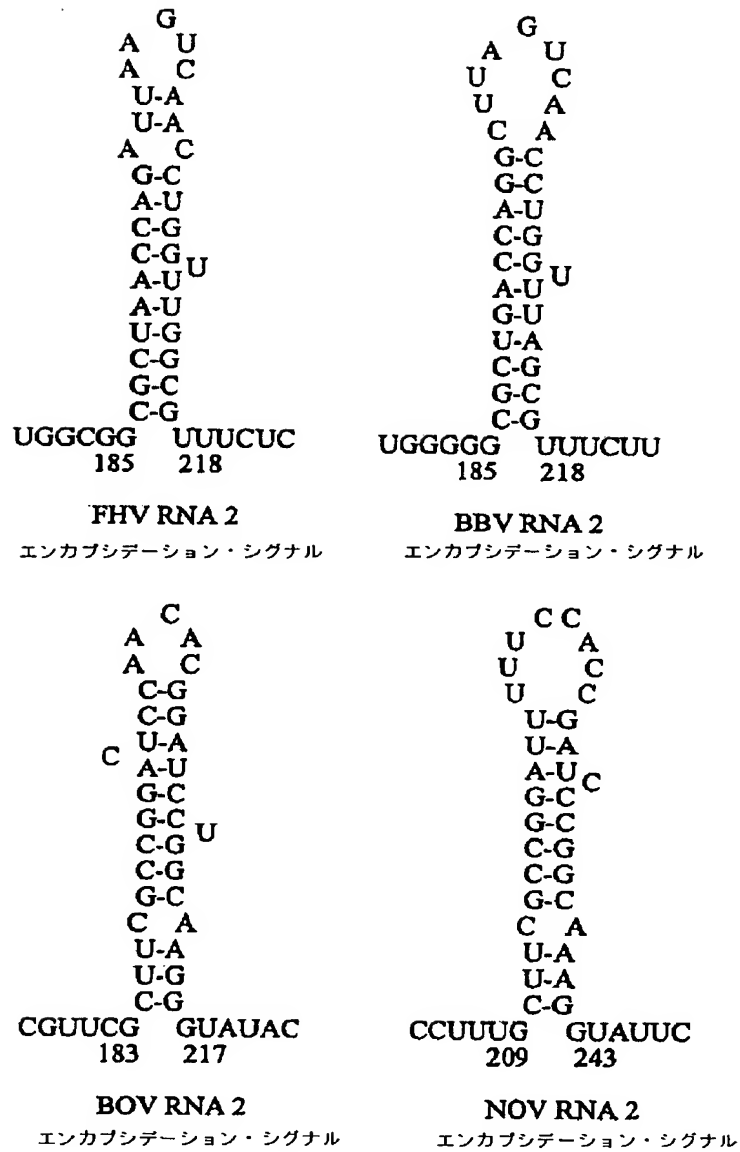


FIG. 2

【図3】

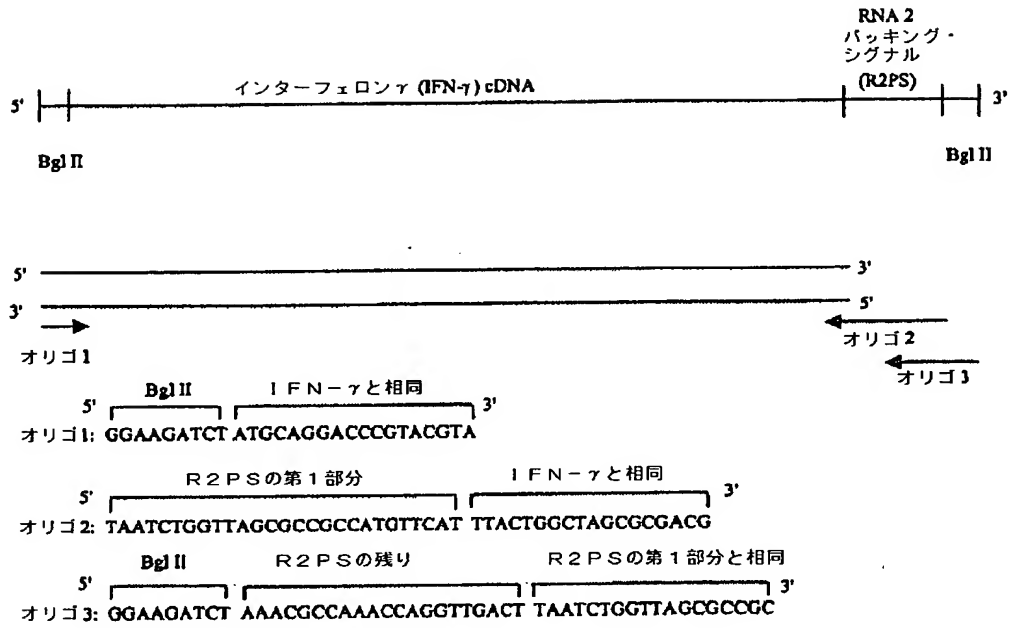


FIG. 3

p2BS (+) -wt Sequence

RNA2挿入配列に直接隣接している配列は、p2BS (+) -wt、p2BS (+) -RNA2 : VSV-G#1、p2BS (+) -RNA2 : BRSV#1の末端を配列決定することにより決定された。

p2BS (+) -wt 5' 末端 (-27 M13 逆向きプライマー)

| | | | | | |
|----|----|--------|----------------------|---------------------------------|----|
| 5' | CC | AAAGCT | CGAAATTAAACCTCACTAAA | GTAAACAATTCCAAAGTTCCAAAATGGTTAA | 3' |
| 3' | GG | TTCGA | CGTTTAATTGGGAGTGATTT | CATTGTTAAGGTTCAAGGTTTACCAATT | 5' |

(SEQ ID NO: 14)

p2BS (+) -wt 3' 末端 (-40 M13 順向きプライマー)

| | | | | | |
|----|------------------------------|--------|------------------------|---|----|
| 5' | AAACCAGTTTAAAGTCAACAGACTAAGG | TCTAGA | GGATCCCGGGTACGAGCTCG | AATTCGCCCTATAGTGTGATCGTATTACAAATTCACCTGGC | 3' |
| 3' | TTTGGTCAAATTCAGTTGTCTGATCC | AGATCT | CCTAGGGGCCCATGGCTCGAGC | TTAAGCGGATATCACTCAGCATATAATGTTAAGTGACCG | 5' |

BamHI SmaI KpnI

(SEQ ID NO: 15)

FIG. 4

p 2BS (+) -RNA 2 : VSV-G構築物

RNA 2の207番目のアミノ酸残基と208番目のアミノ酸残基との間にVSV-Gコーディング配列を挿入するため、オリゴヌクレオチドにより媒介される突然変異誘発が使用された。

RNA 2のペプチド配列及びコーディング配列 :

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|----------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|-----------------|
| GGC | CAA | CGT | TGT | CTA..... | ペプチド..... | GGT | CGG | TGG | TCA | AGC | (銅型) |
| CCG | GTT | GCA | ACA | GAT.... | 挿入部位 |CCA | GCC | ACC | AGT | TCG | (コーディング配列) |
| 203 | P | V | A | T | D | P | A | T | S | S | (アミノ酸配列) |
| | | | | | | | | | | | (SEQ ID NO: 16) |

VSV-Gのペプチド配列及びコーディング配列 :

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|
| TAC | ACA | GAC | ATC | GAG | ATG | AAC | CGA | CTG | GGA | AAG | (SEQ ID NO: 17) |
| Y | T | D | I | E | M | N | R | L | G | K | |

いくつかの保存的な塩基置換によりGCコンテンツを増加させた。

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|
| TAC | ACG | GAC | ATC | GAG | ATG | AAC | CGC | CTG | GGC | AAG | (SEQ ID NO: 18) |
| Y | T | D | I | E | M | N | R | L | G | K | |

RNA 2 : VSV-Gのペプチド配列及びコーディング配列 :

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| 3' | GGC | CAA | CGT | TGT | CTA... | ATG | TGC | CTG | TAG | CTC | TAC | TTG | GCG | GAC | CCG | TTC... | GGT | CGG | TGG | TCA | AGC | (銅型) |
| 5' | CCG | GTT | GCA | ACA | GAT... | TAC | ACG | GAC | ATC | GAG | ATG | AAC | CGC | CTG | GGC | AAG... | CCA | GCC | ACC | AGT | TCG | (コーディング配列) |
| | P | V | A | T | D | Y | T | D | I | E | M | N | R | L | G | K | P | A | T | S | S | (アミノ酸配列) |

(SEQ ID NO: 19)

FIG. 5

RNA2 : VSV-G突然変異誘発プライマー及びハイブリダイゼーション・プローブ

RNA2のcDNAがM13 (mp18) ベクターDNAにクローニングされた方法のため、
M13 : RNA2ファージssDNAはRNA2コーディング配列を含む。
従って、突然変異誘発プライマーは、上図の鋳型配列 (5' から3') でなければならぬ。
ハイブリダイゼーション・プローブはブラーク・ハイブリダイゼーションにより突然変異が誘発されたクローンを検出するために使用された。

従って、突然変異誘発プライマー (VSV-P) は以下の通りである :

5' CGA ACT GGT GGC TGG..CTT GCC CAG GCG GTT CAT CTC GAT GTC CGT GTA..ATC TGT TGC AAC CCG 3' (63マー)
(SEQ ID NO: 20)

VSV-Gハイブリダイゼーション・プローブ (VSV-H) :

5' CTT GCC CAG GCG GTT CAT CTC GAT GTC CGT GTA 3' (33マー) (SEQ ID NO: 21)

合成されたプライマー :

(VSV-P, 63 マー)

5' CGA ACT GGT GGC TGG CTT..
GCC CAG GCG GTT CAT CTC..
GAT GTC CGT GTA ATC TGT..
TGC AAC CCG 3' (SEQ ID NO: 20)

(VSV-H, 33 マー)

5' CTT GCC CAG GCG GTT CAT..
CTC GAT GTC CGT GTA 3' (SEQ ID NO: 21)

FIG. 6

RNA2: BRSV 突然変異誘発プライマー

RNA2のcDNAがM13 (mp18) ベクターDNAにクローニングされた方法のため、
M13: RNA2ファージssDNAはRNA2コーディング配列を含む。
従って、突然変異誘発プライマーは、上図の鋳型配列 (逆向きに読む) である鋳型配列 (5'から3') でなければならぬ。
ハイブリダイゼーション・プローブはブラーク・ハイブリダイゼーションにより突然変異が誘発されたクローンを検出するために使用された。

従って、突然変異誘発プライマー (VSV-P) は以下の通りである:

5' CGA ACT GGT GGC TGG ...
TTG TTG GAA TTC TAT CAC AGT TGC TAT GTT GGA TAT CTG ...
ACA ATC ATG ATT GTT AAC TTT AGG TAG AAG CTC TTT GTC ...
ATC TGT TGC AAC CCG 3' (108 マー) (SEQ ID NO: 24)

RNA2:BRSV hybridization probe (BRSV-H):

5' CAC AGT TGC TAT GTT GGA TAT CTG ACA ATC ATG 3' (33 マー) (SEQ ID NO: 25)

合成されたプライマー

(BRSV-P, 108 マー)

5' CGA ACT GGT GGC TGG TTG TTG ...
GAA TTC TAT CAC AGT TGC TAT ...
GTT GGA TAT CTG ACA ATC ATG ...
ATT GTT AAC TTT AGG TAG AAG ...
CTC TTT GTC ATC TGT TGC AAC ...
CGG 3' (SEQ ID NO: 24)

(BRSV-H, 33 マー)

5' CAC AGT TGC TAT GTT GGA TAT ... 3'
CTG ACA ATC ATG
(SEQ ID NO: 25)

FIG. 8

【図 9】

pVL1392-RNA2ハキョウウイルス発現ベクター、pVL1392-RNA2:VSV-Gハキョウウイルス発現ベクター、及びpVL1392-RNA2:BRSVハキョウウイルス発現ベクターの構築

5'末端にNotI部位を付加し、3'末端に存在するXbaI部位を利用するRNA2コーディング配列に基づき設計されたPCRプライマー。断片は、pVL1392ハキョウウイルス発現ベクターのNotI/XbaI部位にクローニングされた。

p2BS(+)-wt 5' 末端 (-27 M13逆向きプライマー)

| | | | | |
|----|-----|-------|----------------------|--------------------------------|
| ?? | pBS | ?? | RNA2 | Start |
| 5' | CC | AGCT | CGAAATTACCCCTCACTAAA | GTAAACAATTCCAAAGTTCGAAATGGTTAA |
| 3' | GG | TTGGA | CGTTTAATTGGGAGTGATTT | CATTGTGTTAAGGTTCAAGGTTTACCAATT |

(SEQ ID NO: 14)

p2BS(+)-wt 3' 末端 (-40 M13順向きプライマー)

| | | | | | |
|----|----------------------------|--------|------------------------|---|----|
| 5' | AAACCGTTTAAGTCAACAGACTAAGG | TCTAGA | GGATCCCGGGTACCGAGCTCG | AATTGGCCCTATAGTGAAGTCTGATTACAATTCACTGGC | 3' |
| 3' | TTTGGTCAAAATTCAGTTGCTGATTC | AGATCT | CCTAGGGGCCCATGGCTCGAGC | TTAGCGGATATCACTCAGCATAAATGTTAAGTGACCG | 5' |

RNA2 XbaI pBS
BanHI SmaI KpnI (SEQ ID NO: 15)

pVL1392:RNA2のDNA配列 (PCRプライマー配列に直線を付した) :

| | | | | | |
|---------|------------------------|-----------|-------------------------------|--------------------|---------|
| pVL1392 | NotI | RNA2 5' | RNA2 3' | XbaI | pVL1392 |
| 5' | TGCGGCGCGGATCAGATCTGCA | GC GCGCGC | GTAAACAATTCCAAAGTTCGAAATGGTTA | --AGTCAACAGACTAAGG | T CTAGA |
| 3' | AGCCCGCGCCTAGTCTAGACGT | CGCGCG CG | CATTGTGTTAAGGTTCAAGGTTTACCAAT | --TCAGTGTCTGATTC | AGATC T |

(SEQ ID NO: 26)

FIG. 9

RNA2構築物をpVL1392へサブクローニングするためのプライマー

5' NotI/RNA2 プライマー (NT-RNA2)
5' CA GCGGCCGC ^{NotI} GTA AAC AAT TCG AAG TTC CAA AAT GG 3' (36マー、下線付きの26塩基は鋳型DNAと一致する)
(SEQ ID NO: 27)

3' XbaI/RNA2 プライマー (RNA2-X)
5' CC ^{XbaI} TCTAGA CCT TAG TCT GTT GAC 3' (23マー、全ての塩基が鋳型DNAと一致する)
(SEQ ID NO: 28)

合成されたプライマー

(NT-RNA2, 36マー)

5' CAG CGG CCG CGT AAA CAA
TTC CAA GTT CCA AAA TGG 3' (SEQ ID NO: 27)

(RNA2-X, 23マー)

5' CCT CTA GAC CTT AGT CTG TTG AC 3' (SEQ ID NO: 28)

FIG.10

p 2BS (+) -RNA2: HBV構築物

RNA2の207番目のアミノ酸残基と208番目のアミノ酸残基との間にHBVエポトープのコーディング配列を挿入するため、オリゴヌクレオチドにより媒介される突然変異誘発が使用された。

RNA2のペプチド配列及びコーディング配列:

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-------|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| CCG | GTT | GCA | ACA | GAT | | ペプチド | | CCA | GCC | ACC | AGT | TCG | (コーディング配列) |
| GGC | CAA | CGT | TGT | CTA | | 挿入部位 | | GGT | CGG | TGG | TCA | AGC | (挿入) |
| 203 | P | V | A | T | D | | | P | A | T | S | S | (アミノ酸配列) |

(SEQ ID NO: 16)

Pres2 132-145のペプチド配列及びコーディング配列:

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 132 | CAA | GAC | CCT | AGA | GTT | AGA | GGA | CTA | TAC | TTC | CCT | GCA | GGA | 145 |
| Q | D | P | R | V | R | G | L | Y | F | P | A | G | G | |

(SEQ ID NO: 29)

RNA2: PRES2 132-145のペプチド配列及びコーディング配列:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 3' | CCG | GTT | GCA | ACA | GAT | .. | CAA | GAC | CCT | AGA | GTT | AGA | GGA | CTA | TAC | TTC | CCT | GCA | GGA | GGA | .. | CCA | GCC | ACC | AGT | TCG |
| 5' | GGC | CAA | CGT | TGT | CTA | .. | GTT | CTG | GGA | TCT | CAA | TCT | CCT | GAT | ATG | AGG | GGA | CGT | CCT | CCT | .. | GGT | CGG | TGG | TCA | AGC |
| | P | V | A | T | D | | Q | D | P | R | V | R | G | L | Y | F | P | A | G | G | | P | A | T | S | S |

(SEQ ID NO: 30)

HBs178-204のペプチド配列及びコーディング配列:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 178 | AAA | CAA | GCA | GGA | TTC | TTC | CTG | CTG | ACA | AGA | ATA | CTG | ACG | ATA | CCT | CAA | AGC | CTG | GAC | AGC | TGG | TGG | ACA | AGC | CTG | AAC | TTT |
| L | Q | A | G | P | F | L | L | T | R | I | L | T | I | P | Q | S | L | D | S | W | H | T | S | L | N | F | |

(SEQ ID NO: 31)

RNA2: HBs178-204のペプチド配列及びコーディング配列:

| | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 3' | CCG | GTT | GCA | ACA | GAT | ... |
| 5' | GGC | CAA | CGT | TGT | CTA | ... |
| | P | V | A | T | D | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AAA | CAA | GCA | GGA | TTC | TTC | CTG | CTG | ACA | AGA | ATA | CTG | ACG | ATA | CCT | CAA | AGC | CTG | GAC | AGC | TGG | TGG | ACA | AGC | CTG | AAC | TTT | ... |
| TTT | GTT | CGT | CCT | ANG | AGG | GAC | GAC | TGT | TCT | TAT | GAC | TGC | TAT | GGA | GTT | TCG | GAC | CTG | TCG | ACC | ACC | TGT | TCG | GAC | TTG | AAG | ... |
| L | Q | A | G | P | F | L | L | T | R | I | L | T | I | P | Q | S | L | D | S | W | T | S | L | N | F | | |

| | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| CCA | GCC | ACC | AGT | TCG |
| GGT | CGG | TGG | TCA | AGC |
| P | A | T | S | S |

(SEQ ID NO: 32)

FIG.11

【図12A】

機能的RNA2：CSP融合物の構築RNA2のペプチド配列及びコーディング配列：

| | | |
|---|---------------------|------------|
| GGC CAA CGT TGT CTA.....Peptide..... | GGT CGG TGG TCA AGC | (鋳型) |
| CCG GTT GCA ACA GAT...Insertion Site... | CCA GCC ACC AGT TCG | (コーディング配列) |
| 203 P V A T D | P A T S S | (アミノ酸配列) |

(SEQ ID NO: 16)

CSPのペプチド配列及びコーディング配列：

| |
|---|
| GAA TGG TCC CCA TGT AGT GTA ACT TGT GGA AAT GGT ... |
| 345 E W S P C S V T C G N G |
| ATA CAA GTT AGA ATA AAG CCT GGC TCT GCT AAT |
| 358 I Q V R I K P G S A N |

(SEQ ID NO: 33)

RNA2：CSPのペプチド配列及びコーディング配列：

| | |
|---|------------|
| 3' GGC CAA CGT TGT CTA ... | |
| 5' CCG GTT GCA ACA GAT ... | |
| P V A T D | |
| CTT ACC AGG GGT ACA TCA CAT TGA ACA CCT TTA CCA ... | |
| GAA TGG TCC CCA TGT AGT GTA ACT TGT GGA AAT GGT ... | |
| Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly | |
| TAT GTT CAA TCT TAT TTC GGA CCG AGA CGA TTA ... | |
| ATA CAA GTT AGA ATA AAG CCT GGC TCT GCT AAT ... | |
| Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn | |
| GGT CGG TGG TCA AGC | (鋳型) |
| CCA GCC ACC AGT TCG | (コーディング配列) |
| P A T S S | (アミノ酸配列) |

(SEQ ID NO: 34)

RNA2：CSPの突然変異誘発プライマー：

RNA2のcDNAがM13 (mp18) ベクターDNAにクローニングされた方法のため、
M13：RNA2ファージssDNAはRNA2コーディング配列を含む。
従って、突然変異誘発プライマーは、上図の鋳型配列（逆向きに読む）である鋳型配列（5'から3'）
でなければならない。
また、ハイブリダイゼーション・プローブも、ブラック・ハイブリダイゼーションにより
突然変異が誘発されたクローンを検出するために使用される。

FIG. 12A

【図12B】

従って、突然変異誘発プライマー（CSP-P）は以下の通りである：

5' CGA ACT GGT GGC TGG ...

ATT AGC AGA GCC AGG CTT TAT TCT AAC TTG TAT ...

ACC ATT TCC ACA AGT TAC ACT ACA TGG GGA CCA TTC ...

ATC TGT TGC AAC CGG 3' (99 mer) (SEQ ID NO: 35)

ハイブリダイゼーションプライマー（CSP-H）は以下の通りである：

5' ACC ATT TCC ACA AGT TAC ACT ACA TGG GGA CCA 3'

(SEQ ID NO: 36)

設計されたプライマー：

(CSP-P, 99 マー)

5' CGA ACT GGT GGC TGG ATT AGC
AGA GCC AGG CTT TAT TCT AAC
TTG TAT ACC ATT TCC ACA AGT
TAC ACT ACA TGG GGA CCA TTC
ATC TGT TGC AAC CGG 3'

(SEQ ID NO: 35)

(CSP-H, 33 マー)

5' ACC ATT TCC ACA AGT TAC ACT
ACA TGG GGA CCA 3'

(SEQ ID NO: 36)

FIG. 12B

【図13】

RNA2配列決定用プライマー：

RNA2-S150 (20マー)

5' CCT CGT GCG ATT ACG TCG GC 3' (SEQ ID NO: 37)

RNA2-S335 (20マー)

5' AGC TGA TAG ATT GAT TGA GG 3' (SEQ ID NO: 38)

RNA2-S560 (20マー)

5' TCG ACG TTG GGT AAA TAC CC 3' (SEQ ID NO: 39)

RNA2-S830 (20マー)

5' CCA AGG GAC ACA TTA GCA GG 3' (SEQ ID NO: 40)

RNA2-S1010 (20マー)

5' TGG TAT AAC ATG GCG TTT GG 3' (SEQ ID NO: 41)

RNA2-S1220 (20マー)

5' GCT GAC AGT CCA CTA ATA CC 3' (SEQ ID NO: 42)

RNA2-S1160R (20マー)

5' GCT GCT GCA AGC AAC ATT CC 3' (SEQ ID NO: 43)

その他の配列決定用プライマー：

pQE-S (22マー) Type III/IV pQE sequencing primer.

5' CAC AGA ATT CAT TAA AGA GGA G 3' (SEQ ID NO: 44)

FIG.13

【図14】

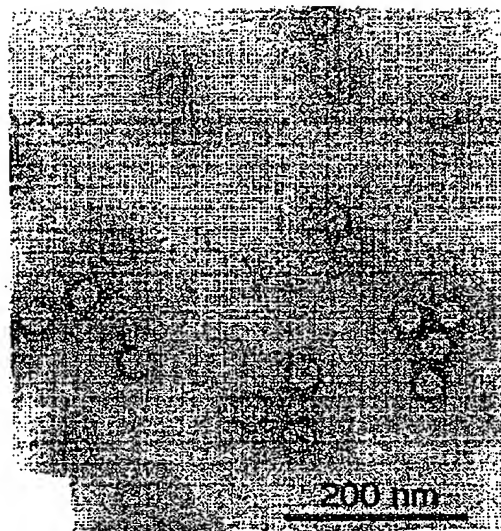


FIG. 14A

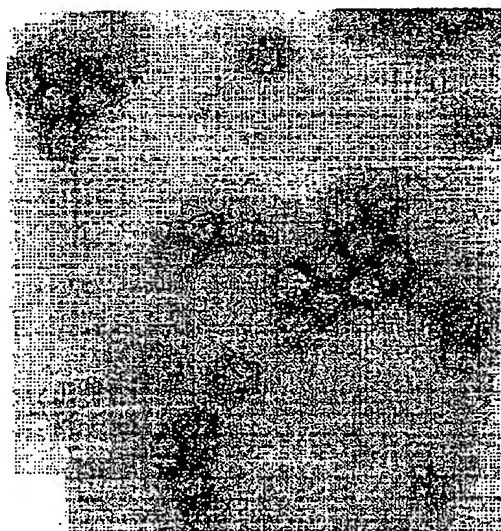


FIG. 14B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/25922

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C07K 14/145; A61K 39/205; C12N 15/40; C07H 21/04 US CL : 530/350; 424/224.1; 435/320.1, 348; 536/23.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|---|--|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350; 424/224.1; 435/320.1, 348; 536/23.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, DIALOG | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X - Y | BURATTI, E. et al. Improved Reactivity of Hepatitis C Virus Core Protein Epitopes in a Conformational Antigen-Presenting System. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. March 1997, Vol. 4, No. 2, pages 117-121, see entire document, especially Fig. 1. | 1, 2 ----- 3, 4, 13-24, 27-38 |
| X - Y | BURATTI, E. et al. Conformational Display of Two Neutralizing epitopes of HIV-1 gp41 on The Flock House Virus Capsid Protein. Journal of Immunological Methods. 1996, Vol. 197, pages 7-18, see entire document, especially Fig. 1. | 1, 2 ----- 3, 4, 13-24, 27-38 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 23 FEBRUARY 1999 | | Date of mailing of the international search report 11 MAR 1999 |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 303-3230 | | Authorized officer DONNA C. WORTMAN, PH.D. <i>Donna Wortman</i> Telephone No. (703) 302-0196 |

【国際調査報告】

| | | |
|--|---|---|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US98/25922 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C07K 14/145; A61K 39/205; C12N 15/40; C07H 21/04 US CL : 530/350; 424/224.1; 435/320.1, 348; 536/23.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350; 424/224.1; 435/320.1, 348; 536/23.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, DIALOG | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X - Y | BURATTI, E. et al. Improved Reactivity of Hepatitis C Virus Core Protein Epitopes in a Conformational Antigen-Presenting System. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. March 1997, Vol. 4, No. 2, pages 117-121, see entire document, especially Fig. 1. | 1, 2 ----- 3, 4, 13-24, 27-38 |
| X - Y | BURATTI, E. et al. Conformational Display of Two Neutralizing epitopes of HIV-1 gp41 on The Flock House Virus Capsid Protein. Journal of Immunological Methods. 1996, Vol. 197, pages 7-18, see entire document, especially Fig. 1. | 1, 2 ----- 3, 4, 13-24, 27-38 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 23 FEBRUARY 1999 | | Date of mailing of the international search report 11 MAR 1999 |
| Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230 | | Authorized officer <i>Donna C. Wortman</i> DONNA C. WORTMAN, P.H.D. Telephone No. (703) 305-0196 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/25922

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | SCODELLER, E.A. et al. A new epitope presenting system displays HIV-1 V3 loop sequence and induces neutralizing antibodies. Vaccine. 1995, Vol. 13, No. 13, pages 1233-1239, see entire document. | 1-4, 13-24, 27-38 |
| Y | KREIS, T.E. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. The EMBO Journal. 1986, Vol. 5, No. 5, pages 931-941, see entire document, especially Table 1. | 3, 4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/23922

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 13-24, 27-38

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | ターマコード (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 5/10 | | C 1 2 N 7/00 | |
| 7/00 | | C 1 2 P 21/00 | C |
| 15/09 | Z N A | C 1 2 N 5/00 | A |
| C 1 2 P 21/00 | | 15/00 | Z N A A |

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ホール, ステイブン・ジー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92126、
 サン・ディエゴ、コンパス・ポイント・ド
 ライブ・ノース・11577-4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 DA02 DA05
 EA02 GA11 HA01 HA12 HA15
 4B064 AG01 AG31 CA10 CA19 CC24
 DA01 DA15
 4B065 AA26X AA90X AA95Y AB01
 AC14 BA02 CA24 CA45
 4C085 AA03 AA16 BA99
 4H045 AA10 BA10 BA41 CA01 DA86
 EA22 EA31 EA53 FA74

THIS PAGE BLANK (USPTO)